



Le système phénoloxydase : caractérisation biochimique et rôle dans la réponse immunitaire chez la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* exposée à *Vibrio* *tapetis*

Cédric Le Bris

► To cite this version:

Cédric Le Bris. Le système phénoloxydase : caractérisation biochimique et rôle dans la réponse immunitaire chez la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* exposée à *Vibrio tapetis*. Immunologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0054 . tel-01064336

HAL Id: tel-01064336

<https://theses.hal.science/tel-01064336>

Submitted on 16 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Mention : biologie marine

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Cédric LE BRIS

Préparée à l'institut Universitaire Européen
de la Mer (IUEM), au Laboratoire des
Sciences de l'Environnement Marin
(LEMAR - UMR 6539)

Le système phénoloxydase :
caractérisation biochimique
et rôle dans la réponse
immunitaire chez la palourde
japonaise *Venerupis*
***philippinarum* exposée à**
Vibrio tapetis

Thèse soutenue le 17 décembre 2013
devant le jury composé de :

Bassem ALLAM
Professeur, Université de Stony Brook / Rapporteur

Bernard DUVIC
Chargé de recherche, INRA, Montpellier / Rapporteur

Charlotte CORPOREAU
Chercheur IFREMER, Brest / Examineur

Marie-Agnès TRAVERS
Chercheur IFREMER, La Tremblade / Examineur

Christine PAILLARD
Directrice de recherche CNRS, Brest / Co-directrice de thèse

Fabienne GUERARD
Professeur, UBO, Brest / Directrice de thèse

Remerciements

J'adresse mes tout premiers remerciements à Bassem Allam et à Bernard Duvic qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse et de faire le déplacement pour assister à ma soutenance. Je remercie également vivement Charlotte Corporeau et Marie-Agnès Travers pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie chaleureusement Fabienne Guérard pour m'avoir accordé sa confiance il y a 3 ans de cela. Merci tout d'abord pour ta gentillesse et ta bienveillance. Merci de m'avoir transmis tes connaissances, ton savoir-faire, merci d'avoir toujours trouvé le temps de m'écouter, de discuter avec moi malgré un emploi du temps déjà bien rempli. Merci de m'avoir donné les moyens de réussir, de m'avoir toujours donné des conseils avisés tout en me laissant « grandir » et devenir autonome. Merci aussi de m'avoir fait confiance pour te seconder dans la dispense des travaux pratiques auprès d'étudiants de Master.

Je remercie également Christine Paillard qui m'a encadré au cours de ces 3 ans de thèse et qui m'a aussi vu faire mes débuts dans le monde de la recherche en suivant mes travaux de stage de Master1. Merci d'avoir partagé tes connaissances avec moi, d'avoir pris le temps de discuter, d'écouter mes idées et d'échanger nos points de vue. Merci aussi pour les fous rires qui ont ponctué nos longues journées de travail au Japon et je garde particulièrement en tête l'épisode du moustique qui s'est invité à l'apéro et qui a été responsable d'un des plus grands fous rires que j'ai jamais eu.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin (LEMAR), aussi je tiens à remercier Laurent Memery, directeur du laboratoire à mon arrivée il y a 3 ans et Olivier Ragueneau, actuel directeur du LEMAR pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes de recherche.

Je remercie l'Ecole Doctorale des Sciences de la Mer (EDSM) et plus personnellement Fred Jean et Elisabeth Bondu pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci à la SATMAR (Société ATlantique de MARiculture) pour nous avoir gracieusement fourni le grand nombre de palourdes nécessaire à la réalisation des travaux présentés dans ce manuscrit. Je remercie plus particulièrement Noël et Nicolas qui nous ont accueillis sur le site de l'Ile Tudy et qui nous ont beaucoup aidés dans la collecte des palourdes toujours dans la bonne humeur. Je remercie également les quelques milliers de palourdes sacrifiées pour l'obtention des résultats présentés dans ce manuscrit.

Je tiens à remercier chaleureusement Corinne Floc'h-Laizet pour m'avoir appris les rudiments de l'administration du laboratoire à mon arrivée au LEMAR et pour m'avoir aidé également dans mes démarches avec le Labex MER. Le Labex MER que je tiens aussi à remercier pour m'avoir permis de partir au Japon présenter mes résultats de thèse en congrès mais aussi de travailler à l'institut de recherche national d'aquaculture au Japon et plus particulièrement à la station de Nansei. Merci à Tomomasa Matsuyama d'avoir accepté notre projet de collaboration, de nous avoir accueilli au sein de son équipe et de son laboratoire. Merci aussi pour avoir pris le temps de nous faire découvrir ce magnifique pays qu'est le Japon.

Merci aussi à la grande équipe du LEMAR : Christophe, Nelly, Caro, Philippe, Fabi, Hélène, Gauthier, Doudou, Aurélie, Ika, Manon, Anne-Laure, Coraline, Mickael, Alain et tous les

autres que j'oublie. Travailler dans une telle bonne humeur aura été, grâce à vous tous, un vrai plaisir.

J'adresse des remerciements particuliers à des collègues qui sont aujourd'hui des amis très proches. Merci à Romain et Aude que je connais depuis mon arrivée à Brest (7ans déjà), bientôt docteurs, ne changez pas les blonds vous êtes des amis sur qui j'ai toujours pu compter. Merci à Sébastien (Pap !), pour les innombrables fous rires que nous avons partagés, merci pour ta sincérité et ta bonne humeur qui n'est absente qu'en cas de panne de cafetière ! Ce sera un honneur d'être ton témoin ! Merci à mon italienne préférée : Morgana qui m'a accueilli dans le bureau à mon arrivée, merci d'avoir toujours été à l'écoute et de le rester malgré la distance, merci aussi pour m'avoir montré l'exemple pour réussir sa thèse ! Merci à Marco, « paix et félicité » ! Ne change pas, tu es un vrai gentil sur qui j'ai toujours pu compter. Tiens bon ça sera bientôt ton tour de rendre ton manuscrit. Merci à mes 2 américains préférés : JP et Chloé : merci de nous avoir fait découvrir le Lavandou grâce à votre superbe mariage ! Rassurez-vous, ce n'est pas parce que l'Atlantique nous sépare que vous n'êtes plus parmi nous ! Merci à Adeline (Bibiche !) pour ton travail à mes côtés bien sur mais surtout pour la confiance réciproque que nous avons pu nous accorder, pour ton écoute et nos nombreux fous rires. Merci Malwenn de nous avoir rejoint dans notre bureau il y a 2 ans avec ta gentillesse, ta bonne humeur et ta relative surdité ... Merci à Camille qui est une vraie gentille et je pense vraiment que tu devrais être remboursée par la sécurité sociale tant tu apportes de la bonne humeur ! Merci à Mélanie que j'ai vu arriver en tant que stagiaire au LEMAR, qui a très vite trouvé sa place parmi nous ... on en ri depuis quelques années mais c'est à mon tour de partir dans le nord ... ! Merci à Guillaume, « Pantalon bleu », le marin parisien fan de piña colada ! Merci à Bichon, le roi du Guacamole et à Joana. Merci à Ptit Marc de ne pas avoir pris peur en découvrant le monde de la recherche avec nous ! Merci à Nolwenn qui a dû avoir peur le jour où elle a intégré notre bureau et s'est rendu compte de l'étendue de la folie qui y règne ! Un grand merci aussi à Gaëlle qui m'a beaucoup aidé, notamment à me sortir des méandres des statistiques. Merci à toi et aussi à Margot, de m'avoir rejoint dans le labo de biochimie. Profitez en bien ... 3 ans ça passe très vite ! Merci aussi à ceux qui ne sont pas, ou plus au labo mais presque : Myrina, Tony, Mathias, Charlénita ... Un grand merci également à Fanny avec qui j'ai fait mes premiers pas au LEMAR il y a cinq ans maintenant.

Merci aussi à la formidable équipe du secrétariat du LEMAR et je remercie très sincèrement Geneviève Cohat et Anne-Sophie Podeur qui ont toujours su être disponibles et bienveillantes avec moi. Merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur qui vont beaucoup me manquer. Merci aussi pour nos « réunions potins » qui nous permis de bien rigoler et de travailler dans la bonne humeur.

Un grand merci aussi à Sébastien Hervé pour sa disponibilité et son talent que ce soit pour la réalisation de figures ou de posters. Merci aussi à Olivier Gauthier et Fabrice Pernet pour leur aide très précieuse dans les analyses statistiques. Je remercie aussi, Catherine Séguineau et Claudie Quéré. Merci aussi à Jérôme La Peyre d'avoir pris le temps de s'intéresser à mon travail et de m'avoir conseillé.

Je voudrais adresser mes remerciements aux stagiaires dont j'ai eu la responsabilité de l'encadrement au cours de ma thèse : Marion, Damien, Maxime et Xavier. Un merci particulier à Maxime, pour nous avoir apporté un peu de soleil basque au laboratoire avant de s'envoler vers les îles, et à Xavier pour avoir enrichi notre vocabulaire de nombreuses expressions canadiennes !

Je tiens également à saluer et à remercier des personnes sans qui l'IUEM ne tournerait pas : Sophie et Yannick : merci pour votre gentillesse et votre disponibilité. Merci aussi à Pascal et Marc qui ne sont plus aujourd'hui à l'IUEM mais qui ont aussi fait partie de ces personnes indispensables à la vie de l'institut.

Je souhaite aussi remercier le personnel de l'UFR sciences de Brest et plus particulièrement du département de biologie. Je remercie Jean Laroche, Jonathan Flye Sainte Marie, Julien Thébault, Caroline Fabioux et Jacques Baron pour m'avoir accordé leur confiance pour diriger les séances de travaux pratiques de leurs unités d'enseignement respectives. Un grand merci à Christiane Julou qui m'a accompagné dans mes premiers pas en tant que moniteur. Merci aussi à Elisabeth Poirier qui m'a apporté son aide et ses conseils pour les tout derniers travaux pratiques de ma carrière de moniteur. Merci aussi aux nombreux étudiants de tout niveau que j'ai vu défiler en salle de TP au cours de ces 3 années de m'avoir supporté !

Je remercie Sami Ben Lamine qui a toujours été disponible et pédagogue pour répondre à mes questions techniques lorsque le spectromètre ne voulait plus coopérer ... J'en profite aussi pour remercier mon plus grand allié de laboratoire : le spectromètre avec qui j'ai passé plus de 450 heures au cours de ces 3 années.

Je remercie tout particulièrement ma famille qui ne m'a pas beaucoup vu ces derniers mois mais qui m'a toujours soutenu et encouragé. Merci à mes parents pour avoir toujours cru en moi et m'avoir toujours encouragé. Merci aussi à Aurélie, Steph, Mattéo et Maïdi pour leur soutien et leurs encouragements.

Un grand merci aussi à ceux que je considère comme ma famille brestoise et tout spécialement à mon frère et à ma belle-sœur : Aurélien et Susie merci pour m'avoir suivi et encouragé au cours de ces 3 ans. Merci pour tout, vous êtes des gens formidables dont je ne saurais plus me passer ! Merci aussi à Manue, Flo, Hélène, Julien. Je n'oublie pas non plus de remercier la grande équipe d'Océanopolis que j'ai quittée pour démarrer cette thèse. Merci à Anne Rognant pour m'avoir fait confiance (malgré mon jeune âge !) et pour m'avoir permis de partager ma passion pour le milieu marin mais aussi pour avoir continué à me suivre et à m'encourager.

Afin de n'oublier personne, je tiens à remercier, tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail de thèse et ceux qui m'ont soutenu pendant ces trois ans.

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre 1: Etat de l'art	7
1. Les phénoloxydases : aspects biochimiques	8
1. 1. Classification des POs	8
1. 2. Site actif des POs.....	9
2. Activités POs.....	12
2. 1. Activation des POs	12
2. 2. POs et péroxinectines	15
2. 3. Les produits de réaction des POs	15
2. 4. POs et hémocyanines	16
3. POs et mélanisation.....	17
3. 1. Rôle de photoprotection	17
3. 2. Rôle Structural.....	19
3. 3. Rôle de chémoprotection.....	20
3. 4. Applications biotechnologiques	21
4. POs et système immunitaire des invertébrés.....	22
4. 1. Immunité humorale, immunité cellulaire	23
4. 2. Caractérisation biochimique des POs.....	26
4. 2. 1. Utilisation de substrats et d'inhibiteurs spécifiques	26
4. 2. 2. Conditions optimales d'activité.....	27
4. 2. 3. Purification des POs	28
4. 3. Activité PO et stress biotiques	29
4. 4. Activité PO et stress abiotiques.....	31
4. 4. 1. Température, pH, oxygène, salinité.....	31
4. 4. 2. Contaminants chimiques	33
4. 5. Effets couplés de stress biotiques et abiotiques	34
5. Modèle biologique : la palourde japonaise <i>Venerupis philippinarum</i>	35
5. 1. Classifications, origine et répartition de l'espèce.....	35
5. 1. 1. Classifications phylogénétique et taxonomique	35
5. 1. 2. Origine et répartition de l'espèce.....	37
5. 2. Biologie, anatomie et écologie de <i>Venerupis philippinarum</i>	38
5. 2. 1. Biologie de <i>Venerupis philippinarum</i>	38
5. 2. 2. Anatomie de l'espèce	38
5. 2. 3. Reproduction et cycle de vie	40
5. 3. La maladie de l'anneau brun	42

5. 3. 1. Historique de la maladie de l'anneau brun	42
5. 3. 2. L'agent pathogène : <i>Vibrio tapetis</i>	43
5. 3. 3. Développement de la maladie	44
5. 3. 4. La classification de la maladie de l'anneau brun.....	46
5. 3. 4. 1. Les stades de développement de la maladie de l'anneau brun	46
5. 3. 4. 2. Les stades de réparation coquillière.....	47
5. 3. 5. Réponses physiologique et immunitaire de <i>V. philippinarum</i> face à la MAB	47
5. 3. 5. 1. Réponse physiologique face à la MAB	47
5. 3. 5. 2. Réponse immunitaire face à la MAB	48
5. 3. 5. 2. 1. Dans l'hémolymphe.....	48
5. 3. 5. 2. 2. Dans les fluides extrapalléaux	48
5. 4. Conclusion.....	49
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	50
1. Matériel biologique : origines et acclimatation.....	51
1. 1. Caractérisation biochimique de l'activité PO et étude <i>in vitro</i> de l'effet d'ECPs sur l'activité PO de <i>V. philippinarum</i>	51
1. 2. Etude de la réponse enzymatique à une exposition à <i>Vibrio tapetis</i> et à un challenge thermique chez <i>V. philippinarum</i>	52
1. 3. Recherche d'un cycle endogène au niveau des activités enzymatiques chez <i>V. philippinarum</i>	53
1. 4. Comparaison de la pathogénicité de deux souches de <i>Vibrio tapetis</i> sur des populations japonaises de <i>V. philippinarum</i>	54
1. 5. Caractérisation biochimique de l'activité PO chez <i>H. tuberculata</i>	55
2. Prélèvements des fluides et tissus	56
2. 1. Prélèvements des fluides chez <i>V. philippinarum</i>	56
2. 2. Prélèvement des tissus chez <i>V. philippinarum</i>	57
2. 3. Prélèvement de l'hémolymphe chez <i>H. tuberculata</i>	57
3. Dosage des protéines totales	58
4. Protocole optimisé de dosage de l'activité phénoloxydase	59
4. 1. Principe de la mesure	59
4. 2. Choix du tampon utilisé	59
4. 3. Composition du milieu réactionnel	59
4. 4. Calcul de l'activité volumique	60
5. Autres dosages enzymatiques.....	61
5. 1. Dosage de l'activité superoxyde dismutase	61
5. 2. Dosage de l'activité catalase	62
6. Substrats et inhibiteurs de l'activité phénoloxydase	63

6. 1. Substrats	63
6. 2. Calcul des constantes cinétiques	64
6. 3. Inhibiteurs.....	66
6. 3. 1. Maximum d'inhibition et IC ₅₀	68
6. 3. 2. Étude du type d'inhibition.....	68
7. Optimum thermique, thermostabilité et pH optimal	69
7. 1. Température optimale de l'activité phénoloxydase	69
7. 2. Thermostabilité de l'enzyme	69
7. 3. pH optimal de l'activité phénoloxydase	70
8. Purification partielle de la phénoloxydase	70
8. 1. Chromatographie d'exclusion stérique.....	70
8. 2. Chromatographie d'échange ionique	71
8. 3. Dosages post-chromatographie	71
9. Electrophorèse bidimensionnelle (selon Artigaud <i>et al.</i> , 2013)	72
9. 1. Réhydratation des strips	72
9. 2. 1 ^{ère} dimension	72
9. 3. Equilibration.....	73
9. 4. 2 ^{ème} dimension.....	73
10. Diagnostic de la maladie de l'anneau brun	74
10. 1. Les stades de maladie	74
10. 2. Les stades de réparation coquillière	75
11. Souches bactériennes.....	76
11. 1. Mise en culture des différentes souches bactériennes utilisées.....	76
11. 2. Récupération des produits extracellulaires (Extra-Cellular Products : ECP) bactériens.....	77
12. Analyses statistiques	77
12. 1. PCNM (Principal Coordinates of Neighbour Matrices).....	77
12. 2. Analyse des corrélations.....	78
12. 3. ANOVA Split-plot et Split-split-plot	79
12. 3. 1. Enzymatic activities associated with <i>Vibrio tapetis</i> infection in the manila clam, <i>Venerupis philippinarum</i>	79
12. 3. 2. Combined effect of temperature and virulence of two <i>Vibrio tapetis</i> strains on phenoloxidase and superoxide dismutase activities during disease development in the manila clam, <i>Venerupis philippinarum</i>	80
12. 4. Régression logistique	80
Chapitre 3 : Caractérisation biochimique d'une activité laccase dans l'hémolymphe de la palourde japonaise <i>Venerupis philippinarum</i> et de l'ormeau européen <i>Haliotis tuberculata</i> ..	81
1. Introduction	82

2. Caractérisation biochimique de l'activité PO dans l'hémolymph de <i>Venerupis philippinarum</i>	82
Article 1. Laccase-like activity in the hemolymph of <i>Venerupis philippinarum</i> : characterization and kinetics properties	82
3. Purification partielle de la phénoloxydase de <i>Venerupis philippinarum</i>	92
3. 1. Chromatographie de filtration sur gel	92
3. 1. 1. Etalonnage de la colonne de SEPHACRYL S-100	92
3. 1. 2. Elution du sérum de palourde.....	93
3. 2. Chromatographie échangeuse d'ions	94
3. 3. Electrophorèse mono et bidimensionnelle et spectrométrie de masse	95
4. Caractérisation biochimique de l'activité PO dans l'hémolymph de <i>Haliotis tuberculata</i>	97
Article 2. Characterization of a laccase-like activity in the hemolymph of the abalone <i>Haliotis tuberculata</i>	98
Chapitre 4 : Rôle de deux enzymes clé, la phénoloxydase et la superoxyde dismutase, dans la réponse immunitaire de la palourde japonaise, <i>V. philippinarum</i> , exposée à <i>V. tapetis</i>	117
1. Etude préliminaire : recherche d'un cycle endogène pour les activités PO et SOD chez la palourde japonaise	118
1. 1. Introduction	118
1. 2. Matériel et méthodes	119
1. 2. 1. Matériel biologique et acclimatation.....	119
1. 2. 2. Prélèvements et préparation des échantillons.....	120
1. 2. 3. Dosage des protéines	120
1. 2. 4. Dosages enzymatiques	121
1. 2. 5. Analyses statistiques	121
1. 3. Résultats	121
1. 3. 1. Paramètres environnementaux	121
1. 3. 2. Variations des activités enzymatiques.....	122
1. 3. 2. 1. Dans l'hémolymph.....	122
1. 3. 2. 2. Dans les branchies	123
1. 3. 3. PCNM.....	123
1. 4. Discussion	125
1. 5. Conclusions	126
2. Etude des activités phénoloxydase et superoxyde dismutase chez <i>Venerupis philippinarum</i> infectée par <i>Vibrio tapetis</i>	128
Article 3. Enzymatic activities associated with <i>Vibrio tapetis</i> infection in the manila clam, <i>Venerupis philippinarum</i>	129

Article 4. Combined effect of temperature and virulence of two <i>Vibrio tapetis</i> strains on phenoloxidase and superoxide dismutase activities during disease development in the manila clam, <i>Venerupis philippinarum</i>	129
3. Etude, <i>in vitro</i> , de l'effet des produits extracellulaires de <i>Vibrio tapetis</i> sur l'activité phénoloxydase de <i>Venerupis philippinarum</i>	179
3. 1. Introduction	179
3. 2. Matériel et méthodes	181
3. 2. 1. Culture des souches bactériennes	181
3. 2. 2. Produits extracellulaires	181
3. 2. 3. Dosage des protéines totales	181
3. 2. 4. Dosage de l'activité phénoloxydase	181
3. 3. Résultats	182
3. 4. Discussion	184
Chapitre 5 : Etude comparée de la pathogénicité de deux souches de <i>Vibrio tapetis</i> sur des populations japonaises de <i>Venerupis philippinarum</i>	188
1. Introduction	189
Article 5. Comparison of phenoloxidase basal activity in hemolymph and extrapallial fluids and sensitivity to <i>Vibrio tapetis</i> in two <i>Venerupis philippinarum</i> populations from Japan.....	190
Discussion et perspectives.....	212
Une activité phénoloxydase caractérisée dans le sérum d'hémolymph de <i>Venerupis philippinarum</i>	213
Réponse enzymatique de <i>Venerupis philippinarum</i> exposée à <i>Vibrio tapetis</i>	217
Effets du facteur température sur l'interaction hôte-pathogène entre <i>Venerupis philippinarum</i> et <i>Vibrio tapetis</i>	220
Activité phénoloxydase et susceptibilité différentielle chez deux populations japonaises de <i>Venerupis philippinarum</i>	222
Bibliographie	226
Annexe 1 : Electrophorèse bidimensionnelle (selon Artigaud et al., 2013).....	256

Liste des figures hors publications

Figure 1. Schéma simplifié de l'interaction entre un hôte, un organisme pathogène et leur environnement pouvant aboutir au développement d'une maladie (M). (Modifié d'après Snieszko, 1973).

Figure 2. Classification des POs. Modifié d'après Walker & Ferrar, 1998. Parmi les 3 sous-classes de POs, les tyrosinases ont des activités crésolase et catécholase, les laccases ont des activités laccase et catécholase et les catéchol oxydases n'ont qu'une activité catécholase.

Figure 3. Laccase de *Streptomyces coelicolor*. (a) Vue générale tridimensionnelle d'un trimère de laccase de *S. coelicolor*. Chacune des 3 chaînes sont des unités actives composées d'un ion cuivre de type I et de trois ions cuivre de type II regroupés dans un groupement trinuélaire. Les terminaisons N et C de la chaîne A ont été notées sur la figure. Les 12 ions cuivre sont représentés en violet. (b) Groupement cuivre trinuélaire : les trois ions cuivres (Cu1, Cu2 et Cu3), en marrons, sont représentés liés à leurs résidus histidines (d'après Skálova *et al.*, 2009).

Figure 4. Mécanisme catalytique de la tyrosinase. La forme « oxy » de la tyrosinase catalyse la conversion d'un monophénol en quinone via la formation d'un ortho-diphénol. Les formes « met » et « oxy » de la tyrosinase peuvent catalyser la transformation d'orthodiphénols en quinones correspondants. Cette réaction s'opère de manière similaire à celle des catéchol oxydases (d'après Matoba *et al.*, 2006).

Figure 5. Schéma de synthèse du système PO depuis l'entrée d'un corps étranger jusqu'à la formation de la mélanine. Schéma principalement conçu à partir des connaissances acquises chez les insectes et les crustacés (Johansson et Söderhäll, 1985 ; Sugumaran, 1991 ; Riley, Wilczek & Mishima, 1995 ; 1997 ; Liang *et al.*, 1997 ; Söderhäll et Cerenius, 1998 ; Kanost *et al.*, 2001 ; Simonet *et al.*, 2002 ; De Gregorio *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 2003 ; Kanost *et al.*, 2004 ; Nappi *et al.*, 2005 ; Christensen *et al.*, 2005 ; Kim & Uyama, 2005 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2007 ; Cerenius *et al.*, 2008, 2010 ; Roulin *et al.*, 2011).

Figure 6. Schéma de synthèse des processus de phagocytose de microorganismes (représentés en rouge) par des cellules hémocytaires. D'après Paillard, 2004a.

Figure 7. Formation de mélanine, sous l'action de la PO, après phagocytose de sporonts de *Marteilia sydneyi* par les hémocytes de *Saccostrea glomerata*. A : La mélanisation débute autour des sporonts phagocytés. B : Phagosome totalement mélanisé. Barre = 5µm. D'après Butt & Raftos, 2008.

Figure 8. Aire de répartition de *Venerupis philippinarum*, à l'échelle mondiale. Les dates correspondent aux dates d'introductions de l'espèce (vert) et d'apparition de la MAB (rouge) dans les différentes zones du globe. Modifié d'après Paillard 2004.

Figure 9. Représentation schématique d'une palourde japonaise, *Venerupis philippinarum*, en coupe transversale (Modifié d'après Paillard, 2004a).

Figure 10. Anatomie interne et orientation d'une palourde japonaise, *Venerupis philippinarum*, dont la valve gauche et le manteau gauche ont été ôtés (Travaux pratiques, Licence, UBO).

Figure 11. Cycle de vie de la palourde japonaise, *Venerupis philippinarum* (Travaux pratiques, Licence, UBO).

Figure 12. Valve droite de palourde japonaise présentant le symptôme caractéristique de la maladie de l'anneau brun.

Figure 13. Adhérence de *V. tapetis*, via ses *pili*, à la lame périostracale de *V. philippinarum*. Observation au microscope à balayage électronique (X 13000). D'après Paillard & Maes, 1995a.

Figure 14. Site de colonisation par *V. tapetis* de la lame périostracale de *V. philippinarum*. D'après Paillard, 2004b (gauche) et Allam *et al.*, 1996a (droite).

Figure 15. Coquille de palourde japonaise présentant, sur chacune de ses valves, l'anneau brun de conchioline, symptomatique de la Maladie de l'Anneau Brun (MAB).

Figure 16. Découpage de la face interne d'une valve de palourde japonaise *Venerupis philippinarum*. sa : zone sub-articulaire, C : zone centrale, Pa : zone périphérique antérieure, Pv : zone périphérique ventrale, Pp : zone périphérique postérieure, S : zone sinusale. (D'après Paillard & Maes, 1994).

Figure 17. Synthèse des stades de dépôts de conchioline (CDS) en fonction de l'expansion des dépôts de conchioline sur la face interne des valves de la palourde. (D'après Paillard & Maes, 1994).

Figure 18. Localisation des installations vénériques de la SATMAR à l'Ile Tudy dans le Finistère sud en Bretagne (France) Source : Cartograf.fr.

Figure 19. Orientation dorso-ventrale et antéropostérieure de la palourde japonaise *V. philippinarum*.

Figure 20. Dispositif expérimental mis en place afin d'étudier l'effet d'une injection de *V. tapetis* chez *V. philippinarum* à deux températures différentes. De l'eau de mer stérile filtrée (EMSF) a été injectée aux individus témoins, la souche *V. tapetis* CECT4600 a été injectée à un tiers des individus et la souche *V. tapetis* LP2 au tiers restant des individus. Chaque condition est étudiée en triplicatas. Les bacs représentés en bleu ont été maintenus à une température moyenne de $15,3 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ et les bacs représentés en orange ont été maintenus à une température moyenne de $22,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Figure 21. Localisation des deux zones d'origine des populations de palourdes japonaise, *V. philippinarum*, étudiées. A : Akkeshi ; B : Matsusaka. Source : Maximilian Dörrbecker.

Figure 22. Répartition des individus dans les différents bacs (A à L) en fonction de leur zone d'origine (M = Matsusaka et A = Akkasi), de leur température d'acclimatation (15 ou 20°C) et des injections reçus (EMSF = Eau de Mer Stérile Filtrée, FPC1121 = *V. tapetis* FPC1121 et CECT4600 = *V. tapetis* CECT4600).

Figure 23. Prélèvement d'hémolymphe sur une palourde japonaise. (A) L'aiguille est insérée en arrière du ligament en position postéro-dorsale. (B) L'aiguille est orientée vers l'extrémité postérieure de l'animale de façon à atteindre le muscle adducteur. (C) En moyenne 1mL d'hémolymphe est prélevé dans le muscle adducteur postérieur d'une palourde japonaise adulte.

Figure 24. Prélèvement des fluides extrapalléaux totaux sur une palourde japonaise adulte. L'aiguille stérile est insérée dans la cavité extrapalléale (périphérique, centrale et subarticulaire) en passant sous les siphons de l'animal puis en traversant les muscles palléaux au niveau de la ligne palléale de l'animal.

Figure 25. Droite de régression linéaire obtenue pour la gamme de concentrations en protéines totales réalisée à partir d'albumine de sérum bovin.

Figure 26. Principe du dosage de la SOD (SOD kit Assay, SIGMA)

Figure 27. Représentation de Lineweaver-Burk ou représentation en double inverse pour une enzyme de type michaelienne. L'ordonnée à l'origine est égale à $1/V_{\max}$ et la pente est égale à K_m/V_{\max} .

Figure 28. Représentation de $1/V$ en fonction de $[S]$ pour une enzyme michaelienne inhibée par un excès de substrat. La droite obtenue coupe l'axe $[S]$ en $-K_i$ ou K_i est la constante d'inhibition du substrat.

Figure 29. Découpage de la face interne de la face interne d'une valve de palourde japonaise *Venerupis philippinarum*. sa : zone sub-articulaire, C : zone centrale, Pa : zone périphérique antérieure, Pv : zone périphérique ventrale, Pp : zone périphérique postérieure, S : zone sinusale.

Figure 30. Classification des symptômes de la Maladie de l'Anneau Brun établie par Paillard et Maes (1994) en fonction du nombre d'aires touchées par les dépôts de conchioline et de l'étendue de celles-ci.

Figure 31. Représentation de la méthode statistique de la PCNM : « Principal Coordinates of Neighbour Matrices ».

Figure 32. Courbe d'étalonnage de la colonne de chromatographie par exclusion de taille (Sephacryl S-100). BSA : Bovine Serum Albumin (albumine de sérum bovin) :66KDa ; Anhydrase carbonique : 29KDa ; Cytochrome C : 12KDa ; Aprotinine : 6,5KDa.

Figure 33. Chromatogramme obtenu après dépôt, sur une colonne de SEPHACRYL S-100 (colonne : L=235mm ; Ø=28mm), de 0,8mL de sérum d'hémolymphe concentré 10,45 fois (teneur initiale en protéines totales du sérum avant concentration : $0,345 \pm 0,016 \text{mg.mL}^{-1}$). Activité PO L-DOPA : activité PO volumique mesurée sur la L-DOPA (40mM) à 492nm ; Activité PO hydroquinone : Activité PO volumique mesurée sur l'Hydroquinone (25mM) à 390nm ; DO 280 : densité optique mesurée à 280nm.

Figure 34. Photographie du gel de SDS-PAGE (12%) après migration d'extraits concentrés de fractions actives issues de chromatographie d'exclusion stérique.

Figure 35. Photographie du gel d'électrophorèse bidimensionnelle (ph 4-7, SDS-PAGE 12%) obtenu après dépôt des fractions actives concentrées issues de la chromatographie d'exclusion stérique.

Figure 36. Dispositif expérimental mis en place pour la recherche d'un cycle endogène sur l'activité de 3 enzymes d'intérêt : la phénoloxydase, la superoxyde dismutase et la catalase chez la palourde japonaise. Les 2 systèmes de bullages sont disposés à chaque extrémité du bac et les arrivées en eau de mer filtrée sont réparties de façon homogène à la surface du bac. La sonde (YSI OMS 600 V2) est immergée à la surface du bac.

Figure 37. Evolution de la salinité (A), de la température et de la concentration en oxygène dissout (B) au cours des 72h de l'expérimentation.

Figure 38. Evolution de l'activité SOD (A) et PO (B) dans le sérum d'hémolymphe en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm écart-type.

Figure 39. Evolution de l'activité spécifique SOD (A), PO (B) et CAT (C) dans le lysat de surnageant de branchies en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm écart-type.

Figure 40. Représentation de la partition de la variance du modèle $Y = f(X, E)$ où Y est la matrice des variables réponses (i.e. les différentes activités enzymatiques) ; X est la matrice des vecteurs propres ayant des valeurs propres positives ; E est la matrice des variables environnementales.

Figure 41. Evolution de l'absorbance corrigée (Absorbances mesurées corrigées de l'absorbance des blancs correspondants), mesurée à 492nm en fonction du temps, pour les différentes concentrations en protéines totales des solutions d'ECPs testées. L'augmentation d'absorbance traduit l'oxydation de la L-DOPA (40mM) par la phénoloxydase. (A) Solutions d'ECPs de *V. tapetis* CECT4600. (B) Solutions d'ECPs de *V. tapetis* LP2.

Figure 42. Contribution de mon travail de thèse à une meilleure connaissance du système PO dans l'interaction Hôte-Pathogène-Environnement.

Figure 43. Schéma du montage à préparer pour couler 12 gels d'électrophorèse bidimensionnelle.

Liste des tableaux hors publications

Tableau 1. Classification taxonomique de la palourde japonaise *Venerupis philippinarum*.

Tableau 2. Synonymies des noms de genre et d'espèce de la palourde japonaise, *Venerupis philippinarum* (d'après Parache, 1982 ; Laruelle 1999).

Tableau 3. Classification taxonomique de *Vibrio tapetis*.

Tableau 4. Synthèse des différents substrats potentiels testés avec leur abréviation et/ou leurs synonymes associés. La nature et la spécificité sont précisées pour chacun des substrats ainsi que la longueur d'onde utilisée pour détecter leur oxydation.

Tableau 5. Synthèse des différents inhibiteurs potentiels testés, des abréviations ou synonymes utilisés dans notre étude. Pour chaque inhibiteur sont également associées les références d'études ayant déjà portées sur leur utilisation.

Tableau 6. Différents types d'inhibition et effets sur les valeurs des constantes cinétiques K_m et V_{max} ou $[I]$ est la concentration en inhibiteur testé.

Tableau 7. Protéines utilisées comme marqueurs de taille pour l'étalonnage de la colonne de chromatographie SEPHACRYL S-100.

Tableau 8. Programme appliqué aux strips pour la 1^{ère} dimension.

Tableau 9. Composition du milieu de culture utilisé pour chacune des souches bactériennes étudiées.

Tableau 10. Bilan de purification à l'issue de la chromatographie de filtration sur gel effectuée sur SEPHACRYL S-100. [Protéines] : concentration en protéines totales ; FP : Facteur de purification ; SEPHACRYL S-100 : fractions actives issues de la chromatographie. Tableau 11. Synthèse des concentrations finales en protéines totales des solutions d'ECPs des souches de *V. tapetis* testées : CECT4600 et LP2.

Tableau 12. Pourcentage d'inhibition de l'activité PO en fonction de la concentration finale en protéines totales des solutions d'ECPs pour les deux souches de *V. tapetis* testées : CECT4600 et LP2.

Tableau 13. Coulage des gels : pour 12 gels préparer 2x 250 ml.

Liste des abréviations

4-HA : 4-metoxyphenol (4-hydroxyanisole)
4-Hr : 4-hexylrésorcinol (4-hexylrésorcinol)
ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ACN : acétonitrile
BICAM : bicarbonate d'ammonium
BSA : bovin serum albumin (albumine de sérum bovin)
CAT : catalase
CDS : conchiolin deposit stage (stades de dépôt de conchioline)
CHT : concentration hémodiaitrique totale
CTAB : cetyl trimethyl ammonium bromide (céthyltriméthylammonium bromide)
DHI : 5,6-dihydroxyindole
DHICA : 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique
DHPPA : 3-(2,4-dihydroxyphényl) propionic acid (acide 3,4-dihydroxyphényl propionique)
DTT : dithiothréitol
ECPs : extracellular products (produits extracellulaires)
EDTA : ethylenediamine tetra acetic acid (acide éthylènediamine tétra-acétique)
EMSF : eau de mer stérile Filtrée
EROs : espèces réactives de l'oxygène
FEP : fluides extraPalléaux
FAO : food and agriculture organization
HBHZ : 4-hydroxybenzhydrazide
HCCA : acide α -Cyano-4-hydroxycinnamique
IC : indice de condition
IC₅₀ : concentration en inhibiteur entraînant 50% d'inhibition de l'activité enzymatique
IEF : isoélectrofocalisation
IPG : immobilized pH gradient
IUBMB : International Union of Biochemistry and Molecular Biology
K_m : constant de Michaelis
K_i : constante de dissociation du complexe enzyme-substrat
LAP : leucine aminopeptidase
L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphénylalanine
LPS : lipopolysaccharides
MAB : Maladie de l'Anneau Brun
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
Mw : Molecular weight
NADA : N-acétyle-dopamine
NBAD : N-beta-alanyledopamine
NO : nitric oxide (Oxyde nitrique)
O-diphénol : ortho-diphénol
OMVs : outer membrane vesicles
OPD : o-phénylènediamine
PAHs : polycyclic aromatic hydrocarbons
PAMPs : pathogen Associated Molecular Patterns (motifs moléculaires associés à des pathogènes)
PCB : polychlorobiphényles
PCNM : principal coordinates of neighbour matrices
P-diphénol : para-diphénol

PGN : peptidoglycanes
pHi : potentiel hydrogène isoélectrique
PHPPA : 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid (acide p-hydroxyphényl propionique)
pI : point isoélectrique
PMF : peptide mass fingerprint
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride (fluorure de phénylméthanesulfonyle)
POs : phénoloxydases
ppA : prophenoloxidase activating enzyme
PPD : p-phénylènediamine
proPOs : prophénoloxydases
proPO-AS : prophenoloxidase Activating System (Système d'activation de la prophénoloxydase)
PRPs : pattern recognition proteins (Protéines de reconnaissance des motifs)
proPXN : propéroxyneptine
PTU : N-phenylthiourea (1-phényl-2-thiourée)
PXN : péroxyneptine
RAB : réparation de l'Anneau Brun
Rf : rapport frontal
SATMAR : Société ATlantique MARiculture
SDS : sodium dodécyl sulfate
SHAM : salicylhydroxamic acid (acide salicylhydroxamique)
SOD : superoxyde dismutase
SRS : Shell Repair Stage (Stades de réparation de la coquille)
SSPs : soluble supernatant proteins
TFA : acide trifluoroacétique
TGS : Tris-glycine-SDS
TLR : toll-like receptors
TNT : 2,4,6-trinitrotoluène
TOF : Time Of Flight
Tris-HCl : Tris-HCl : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TRP : tyrosinase related protein (Protéines associées aux tyrosinases)
UBO : Université de Bretagne Occidentale
UV : ultraviolets
 V_{max} : vitesse maximale d'une enzyme en présence d'un substrat donné
VP1 : *Vibrio* Prédominant 1
XO : xanthine oxydase

Liste des publications et communications

Publications :

Le Bris C., Paillard C., Stiger-Pouvreau V., Guérard F. (2013) Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum* : characterization and kinetic properties. Fish and Shellfish Immunology, 2013, sous presse

Le Bris C., Lepretre M., Paillard C., Guérard F. (2013) Characterization of a laccase-like activity in the hemolymph of the abalone *Haliotis tuberculata*. Soumis à Aquaculture en octobre 2013.

Le Bris C., Richard G., Paillard C., Lambert C., Segueineau C., Gauthier O., Pernet F., Guérard F. Enzymatic activities associated with *Vibrio tapetis* infection in the manila clam, *Venerupis philippinarum*. En préparation, soumission à Fish and Shellfish Immunology en décembre 2013.

Richard G., **Le Bris C.**, Guérard F., Lambert C., Paillard C. Combined effect of temperature and virulence of two *Vibrio tapetis* strains on phenoloxidase and superoxide dismutase activities during disease development in the manila clam, *Venerupis philippinarum*. En préparation, soumission à Fish and Shellfish Immunology en décembre 2013.

Le Bris C., Tomomasa M., Guérard F., Paillard C. Comparison of phenoloxidase basal activity in hemolymph and extrapallial fluids and sensitivity to *Vibrio tapetis* in two *Venerupis philippinarum* populations from Japan. En preparation, soumission à Journal of Invertebrate Pathology en décembre 2013.

Communications :

Orales :

Le Bris C., Puspita M., Paillard C., Guérard F. « Mise en évidence d'une augmentation de l'activité tyrosinase dans la défense immunitaire de la palourde *Ruditapes philippinarum* infectée par *Vibrio tapetis* », IMMUNINV (IMMunité des INVertébrés), 4 au 6 mai 2011, La Colle sur Loup, France.

Le Bris C. « Biochemical assays : phenoloxidase assays » et « Study of phenoloxidase reaction products », BIVALIFE (Management of infectious diseases in oysters and mussels in Europe), 7 et 8 juin 2012, Issy les Moulineaux, France.

Le Bris C., Puspita M., Paillard C., Guérard F. « Demonstration of the increase of a laccase-like activity in immune defense of clams infected by pathogens », National research institute of aquaculture, 27 juin 2012, Mie, Japon.

Le Bris C., Puspita M., Paillard C., Guérard F. « Demonstration of the increase of a laccase-like activity in immune defense of clams infected by pathogens », ISDCI (International Society of Developmental & comparative Immunology), 9 au 13 juillet 2012, Fukuoka, Japon.

Allam B., Tanguy A., Jeffroy F., **Le Bris C.**, Pales Espinosa E, Paillard C. «Analysis of gene transcription in manila clam in response to brown ring disease », IMMUNINV, 17 au 19 octobre 2012, Perpignan, France.

Affichées :

Le Bris C., Paillard C., Guérard F. « Involvement of a laccase activity in the immune system of the clam *Ruditapes philippinarum* », Journée des doctorants de l'EDSM (Ecole doctorale des sciences de la Mer), 25 et 26 octobre 2012, Plouzané, France.

Poster récompensé par l'EDSM : premier prix des présentations sous forme de posters et obtention d'une bourse d'une valeur de 1300 euros afin de partir en congrès à l'étranger.

Le Bris C., Paillard C., Guérard F. « Involvement of a laccase activity in the immune system of the clam *Ruditapes philippinarum* », NSA (National Shellfish Association), 22 au 25 février 2013, Nashville, Tennessee, USA.

Le Bris C., Richard G., Paillard C., Lambert C., Guérard F. « Study of phenoloxidase and superoxide dismutase activities associated with *Vibrio tapetis* infection in the manila clam, *Venerupis philippinarum* », Marinebrazil (Building the Marine Science – French Brazilian Meeting), 3 au 8 novembre 2013, Buzios, Brésil.

Richard G., **Le Bris C.**, Paillard C., Lambert C., Guérard F. « Combined effect of *Vibrio tapetis* infection and temperature challenge on phenoloxidase and superoxide dismutase activities in the manila clam, *Venerupis philippinarum* », Marinebrazil (Building the Marine Science – French Brazilian Meeting), 3 au 8 novembre 2013, Buzios, Brésil.

Introduction générale

Une espèce prometteuse

La palourde japonaise, *Venerupis philippinarum*, est un mollusque bivalve benthique, fouisseur, suspensivore, présent dans les sédiments de nombreuses zones littorales à travers le monde. Cette espèce se nourrit principalement de microphytobenthos mais elle représente avant tout une source de nourriture importante pour des millions d'êtres humains sur la planète. De ce fait, l'impact économique et social de *V. philippinarum* est considérable à tel point que le chiffre d'affaire mondial de la production de l'espèce (pêche et aquaculture confondues) est estimé à 136 milliards de dollars en 2011 (FAO, 2013).

Son nom vernaculaire de palourde japonaise révèle ses origines car, bien que son aire de répartition se soit considérablement élargie en près d'un siècle, elle est originaire de la zone Indopacifique. Il y a encore un siècle, la présence de la palourde japonaise était limitée à une zone littorale s'étendant du Pakistan à l'Est aux îles Kouriles situées au nord du Japon. Depuis sa première introduction à des fins aquacoles, en 1920 à Hawaï, en dehors de son aire de répartition d'origine, la palourde japonaise a par la suite été introduite, volontairement ou accidentellement, sur de nombreux estrans du monde entier.

En France, la palourde japonaise a été introduite entre 1972 et 1975 à des fins aquacoles. En effet, cette espèce présentait une croissance et un taux de recrutement meilleurs que l'espèce autochtone *Venerupis decussata*. Les travaux menés par le CNEXO (aujourd'hui IFREMER), conjugués à une bonne adaptation à de nouveaux environnements et à de forts taux de recrutement ont permis à *V. philippinarum* de se répandre le long des côtes françaises et européennes d'abord de façon artificielle, via les élevages, mais aussi de façon naturelle. En France, l'expansion de l'espèce et des pêcheries qui l'accompagnent, s'est poursuivie jusqu'en 1987 où la production annuelle atteignait 500 tonnes, ce qui laissait entrevoir un bel avenir pour cette espèce dans le secteur vénérique français.

La maladie de l'anneau brun

L'expansion de *V. philippinarum* a subitement et fortement été freinée entre le printemps et l'été 1987 par une forte baisse de la production. Cette chute était le reflet de mortalités très importantes aussi bien dans les élevages que dans les populations sauvages, si

bien qu'en 1989, la production nationale n'excédait pas les 200 tonnes. Les animaux morts, retrouvés à la surface du sédiment, présentaient alors des symptômes particuliers, à savoir un dépôt brun sur la périphérie de la surface interne des valves ce qui a valu son nom à « la Maladie de l'Anneau Brun » (MAB). L'agent étiologique, responsable de la MAB, fut identifié par Paillard et Maes en 1990 et fut nommé *Vibrio* Prédominant 1 (VP1) puis *Vibrio tapetis* (Paillard *et al.*, 1994 ; Borrego *et al.*, 1996).

Depuis les premiers épisodes de mortalités observés, les connaissances sur le développement de la maladie et plus largement sur l'interaction entre *V. philippinarum* et *V. tapetis* ont beaucoup progressé. Dans un premier temps, la bactérie pathogène pénètre à l'intérieur de la cavité palléale de la palourde puis se fixe au périostracum, ce qui entraîne une dégradation de celui-ci et une entrée du *Vibrio* dans la cavité extrapalléale de l'hôte. La colonisation du périostracum par *V. tapetis* provoque une inhibition du processus normal de biominéralisation de la coquille et conduit à la formation de cet anneau brun qui est principalement constitué de conchioline, c'est-à-dire de matrice organique restant après la décalcification coquillière (Paillard *et al.*, 1989). Avec l'avancement de la maladie, le *Vibrio* progresse à l'intérieur de la cavité extrapalléale et peut, en cas de lésions, pénétrer les tissus puis les fluides de l'animal, ce qui provoque la mort de celui-ci par septicémie.

Cette maladie est dite « d'eau froide » car des températures supérieures à 27°C peuvent être mortelles pour *V. tapetis* dont l'optimum thermique de croissance se situe autour de 20°C. Cependant, le développement de la maladie n'est pas seulement fonction des conditions optimales de croissance de la bactérie pathogène mais aussi des capacités de défense et de réparation de l'hôte. Ainsi Paillard *et al.* (2004) ont déterminé la température de 14°C comme étant la température optimale pour le développement de la maladie. La maladie de l'anneau brun peut donc être décrite non pas comme une simple interaction entre un hôte et une bactérie pathogène mais comme une interaction entre un hôte, une bactérie pathogène et leur environnement (Figure 1). Dans un contexte de changement global et de réchauffement climatique, la question peut être posée quant au devenir de cette maladie le long de nos côtes et de son impact sur les activités vénéricoles.

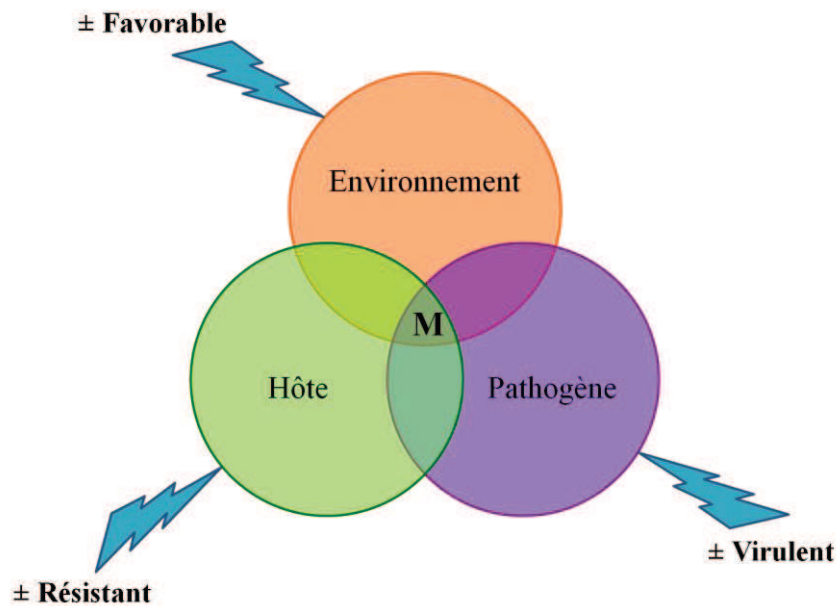


Figure 1. Schéma simplifié de l'interaction entre un hôte, un organisme pathogène et leur environnement pouvant aboutir au développement d'une maladie (M). (Modifié d'après Snieszko, 1973).

Le système enzymatique des phénoloxydases

Depuis près de 25 ans que la MAB a fait son apparition, une somme importante de connaissances a été accumulée tant sur l'hôte, *V. philippinarum*, que sur la bactérie pathogène, *V. tapetis*. De nombreuses études ont déjà porté sur le système immunitaire de la palourde japonaise mais aussi sur la virulence et la pathogénicité de différentes souches de *V. tapetis* (Oubella *et al.*, 1994, 1996 ; Allam *et al.*, 2000a et b, 2001, 2006 ; Paillard *et al.*, 2004 ; Trinkler *et al.*, 2010 ; Jeffroy & Paillard, 2011 ; Brulle *et al.*, 2012 ; Jeffroy *et al.*, 2013). Cependant, dans ce contexte d'interaction tripartite, peu d'études se sont penchées sur le rôle du système enzymatique des phénoloxydases (POs).

Ces enzymes sont des oxydoréductases, cuivre-dépendantes, impliquées dans la synthèse de mélanine et de ses dérivés, dont les produits d'oxydation, par leur toxicité, leurs propriétés bactéricides, fongicides et antivirales interviennent directement dans la lutte contre les organismes pathogènes. Plus largement, les POs sont également impliquées dans la reconnaissance du non-soi, dans les processus d'encapsulation et de réparation des blessures.

Le système enzymatique des POs, qui regroupe trois sous-classes d'enzymes (Tyrosinases, Catéchol oxydases et Laccases), est au centre de nombreuses études au sein du vivant. Chez l'homme, les POs, et particulièrement les tyrosinases, sont activement étudiées pour comprendre, et à terme soigner, la maladie de Parkinson. Chez les invertébrés terrestres,

les POs ont été étudiées chez les arthropodes et spécialement chez certains insectes. De la même manière, chez les invertébrés marins, les crustacés sont au centre de nombreuses études portant sur le système des POs. L'étude de ces enzymes chez les mollusques marins reste à ce jour moins développée bien que récemment, ce système enzymatique ait été exploré chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Luna-Acosta *et al.*, 2010).

Problématique et objectifs

L'ubiquité du système enzymatique des POs au sein de l'immunité en fait un candidat idéal à une utilisation comme biomarqueur des capacités immunitaires des organismes et plus généralement de la réponse des invertébrés marins à une exposition à des facteurs biotiques et/ou abiotiques. Chez la palourde japonaise, une telle utilisation pourrait permettre, à terme d'évaluer (i) les capacités de résistance de l'animal confronté à *V. tapetis*, (ii) la capacité de réparation coquillière d'animaux touchés par la MAB et enfin, (iii) d'effectuer un suivi de l'état de santé de populations exposées à des contaminations ou plus largement au changement global.

Le but de ce travail de thèse est double : caractériser, d'un point de vue biochimique l'activité phénoloxydase de la palourde japonaise *V. philippinarum* et comprendre le rôle et le fonctionnement de la phénoloxydase chez la palourde japonaise dans le cadre de l'interaction hôte-pathogène-environnement. Plus précisément, ce sont les effets de différentes souches de *V. tapetis* sur l'activité phénoloxydase qui ont été testées sur des palourdes japonaises de différentes origines. L'étude de l'activité enzymatique de la PO a été menée en lien avec l'étude d'autres paramètres tels que l'activité d'une enzyme impliquée dans la lutte contre le stress oxydatif, i.e. la superoxyde dismutase (SOD), ainsi que les stades de maladie de l'anneau brun ou encore les stades de réparation de la maladie de l'anneau brun. L'influence de l'environnement au sein de l'interaction tripartite a été étudiée à travers l'effet de la température.

Le **premier chapitre** de la thèse est une synthèse bibliographique présentant dans un premier temps les phénoloxydases, leur fonctionnement et leur rôle dans la synthèse de mélanine. La diversité de fonctions de la mélanine est également traitée et le rôle de la phénoloxydase, enzyme à l'origine de la synthèse de la mélanine, au sein du système immunitaire des invertébrés est exploré. Enfin, ce premier chapitre présente le modèle biologique retenu pour la thèse : la palourde japonaise *Venerupis philippinarum*, et plus

particulièrement, la réponse physiologique et immunitaire de la palourde exposée à la bactérie *Vibrio tapetis*, agent responsable de la maladie de l'anneau brun.

Avant de pouvoir interpréter la réponse enzymatique de la phénoloxydase face à une infection bactérienne, il a été nécessaire de caractériser l'enzyme sur le plan biochimique, et ceci est l'objet des résultats présentés dans le **deuxième chapitre**. Dans le but de déterminer quelle(s) sous-classe(s) de phénoloxydase est (sont) présente(s) chez la palourde, différents substrats et inhibiteurs potentiels ont été testés et les propriétés cinétiques de l'enzyme ont été étudiées. Les conditions optimales de pH et température pour le fonctionnement de l'enzyme ont également été déterminées ainsi que la température de dénaturation de l'enzyme. Puis une purification partielle de l'enzyme a été entreprise afin d'estimer son poids moléculaire ainsi que son point isoélectrique.

Dans le but de mener une étude comparative de l'activité phénoloxydase, des expérimentations de caractérisation biochimique ont été entreprises sur un autre modèle étudié au laboratoire. L'espèce choisie, l'ormeau *Haliotis tuberculata*, est tout comme la palourde en proie, dans son environnement naturel, à des mortalités importantes causées par un *Vibrio*. En effet, *Vibrio harveyi*, lorsqu'il est présent dans des eaux dont la température dépasse les 17°C, entraîne chez des animaux en période de gamétogénèse, des épisodes de mortalités importantes. Le travail mené sur cette espèce a permis de comparer les caractéristiques biochimiques de l'activité PO chez deux espèces de mollusques, un bivalve et un gastéropode, tous deux engagés dans une interaction complexe avec un micro-organisme pathogène du genre *Vibrio*.

Suite à ce travail de caractérisation biochimique de l'activité phénoloxydase dans le sérum de *V. philippinarum*, l'objectif était d'étudier et de comprendre le rôle de cette enzyme dans la défense immunitaire de la palourde au sein de l'interaction hôte-pathogène-environnement. C'est l'objet du **3^{ème} chapitre de la thèse**. En préambule, nous avons recherché l'existence d'un éventuel cycle endogène, de type circadien ou circatidal, cycle susceptible de moduler les activités enzymatiques (PO, SOD, Catalase) de la palourde japonaise.

Puis, des palourdes ont été exposées à deux souches pathogènes de *Vibrio tapetis*, faiblement et fortement virulentes et à des températures plus ou moins favorables au développement de la maladie. Afin de compléter l'étude de la réponse immunitaire au niveau enzymatique, l'activité de la superoxyde dismutase a également été mesurée. Ces activités enzymatiques ont été suivies pendant 30 jours après l'infection par les différentes souches et dans différents compartiments de la palourde plus ou moins proches du site d'infection.

Pour compléter ce travail, nous avons exploré l'influence directe des produits extracellulaires (ECPs) sécrétés par la bactérie sur l'activité phénoloxydase du sérum d'hémolymphe de la palourde. L'effet des produits extracellulaires de deux souches plus ou moins virulentes pour la palourde japonaise a été étudié *in vitro* afin de mieux comprendre le rôle des ECPs sur le système immunitaire de l'hôte et donc sur le développement de la maladie.

Le 4^{ème} **chapitre** a permis de remonter aux origines de l'espèce étudiée en comparant deux populations japonaises de *V. philippinarum*, l'une provenant du nord du Japon et la seconde du sud du Japon. L'activité phénoloxydase « basale » de ces deux populations, vivant dans des environnements contrastés d'un point de vue thermique, a été étudiée. Ces animaux ont également été exposés à deux souches de *V. tapetis* : l'une isolée en France et responsable de mortalités importantes le long des côtes européennes et la seconde, récemment isolée dans les eaux japonaises, dans le but d'évaluer leur virulence relative en diagnostiquant l'avancement de la maladie 30 jours après les infections. L'influence de la température sur le développement de la maladie a également été étudiée au cours de ces travaux.

Le mémoire s'achève sur une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus à travers ces différents chapitres quant au système phénoloxydase chez la palourde japonaise *V. philippinarum*.

Chapitre 1 :

Etat de l'art

1. Les phénoloxydases : aspects biochimiques

Les phénoloxydases (POs) sont des métalloprotéines présentes dans l'ensemble du règne du vivant, des végétaux aux animaux en passant par les champignons. Leur étude a débuté il y a plus d'un siècle chez les champignons (Bertrand, 1896) et se poursuit aujourd'hui chez des espèces et dans des domaines très diversifiés. Ces enzymes sont des oxydoréductases impliquées dans le transport des électrons, qui réduisent le dioxygène en eau (Xu, 2001). Il s'agit de métalloprotéines à cuivre, également appelées « oxydases bleues » en raison des atomes de cuivre qu'elles contiennent au niveau de leur site actif. Le terme de « phénoloxydase » désigne un groupe d'enzymes capable de catalyser l'oxydation de différents composés phénoliques en présence de dioxygène. La nature de ces différents composés va permettre de discriminer trois sous-classes de PO.

1. 1. Classification des POs

Les POs peuvent être différenciées en monophénoloxydases, d'une part (E.C. 1.14.18.1), et diphenoloxydases, d'autre part (E.C. 1.10.3.1 et E.C. 1.10.3.2). Il existe trois sous-classes de POs capable d'oxyder différents composés phénoliques ou non-phénoliques (Walker & Ferrar, 1998). Dans la littérature, une confusion persiste notamment car certains types de composés phénoliques sont des substrats communs à différentes sous-classes de POs, mais aussi parce qu'il peut y avoir une confusion entre l'activité de l'enzyme et la dénomination de la sous-classe enzymatique. Les trois sous-classes de POs sont les suivantes (d'après IUBMB Enzyme Nomenclature, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>):

- ✓ **Tyrosinases : E.C. 1.14.18.1** : elles sont capables d'oxyder les monophénols et les o-diphénols. Également appelées monophénol monooxygénase, cette sous-classe présente deux types d'activité : une activité monophénoloxydase (ou crésolase) qui traduit la capacité à oxyder les monophénols et une activité catécholase (ou diphenoloxydase) qui traduit la capacité à oxyder les o-diphénols. Synonymes : N-acetyl-6-hydroxytryptophan oxydase; monophenol, dihydroxy-L- phenylalanine oxygen oxydoréductase; o-diphénol : O₂ oxydoréductase.
- ✓ **Catécholoxydases : E.C. 1.10.3.1** : elles sont capables d'oxyder les o-diphénols (aussi appelés catéchols). Cette sous-classe ne présente qu'un seul type d'activité, à savoir une activité catécholase ce qui vaut à cette sous classe d'enzyme, par abus de langage, le nom de catécholase. Synonymes : diphenol oxydase; o-diphénolase; phénolase; **polyphénol oxydase**; tyrosinase; pyrocatéchol oxydase; Dopa oxydase; catécholase;

- ✓ **Laccases : E.C. 1.10.3.2** : elles sont capables d'oxyder les o-diphénols et les p-diphénols mais aussi les métoxyphénols et certains substrats non-phénoliques. Cette sous-classe présente deux types d'activité : une activité laccase qui traduit la capacité à oxyder les p-diphénols et une activité catécholase (ou diphénoloxydase) qui traduit la capacité à oxyder les o-diphénols. Synonymes : urushiol oxydase; p-diphénol oxydase.

Pour éviter toute confusion entre ces trois sous-classes il est donc important de bien différencier les activités enzymatiques des enzymes en elles-mêmes (Figure 2)

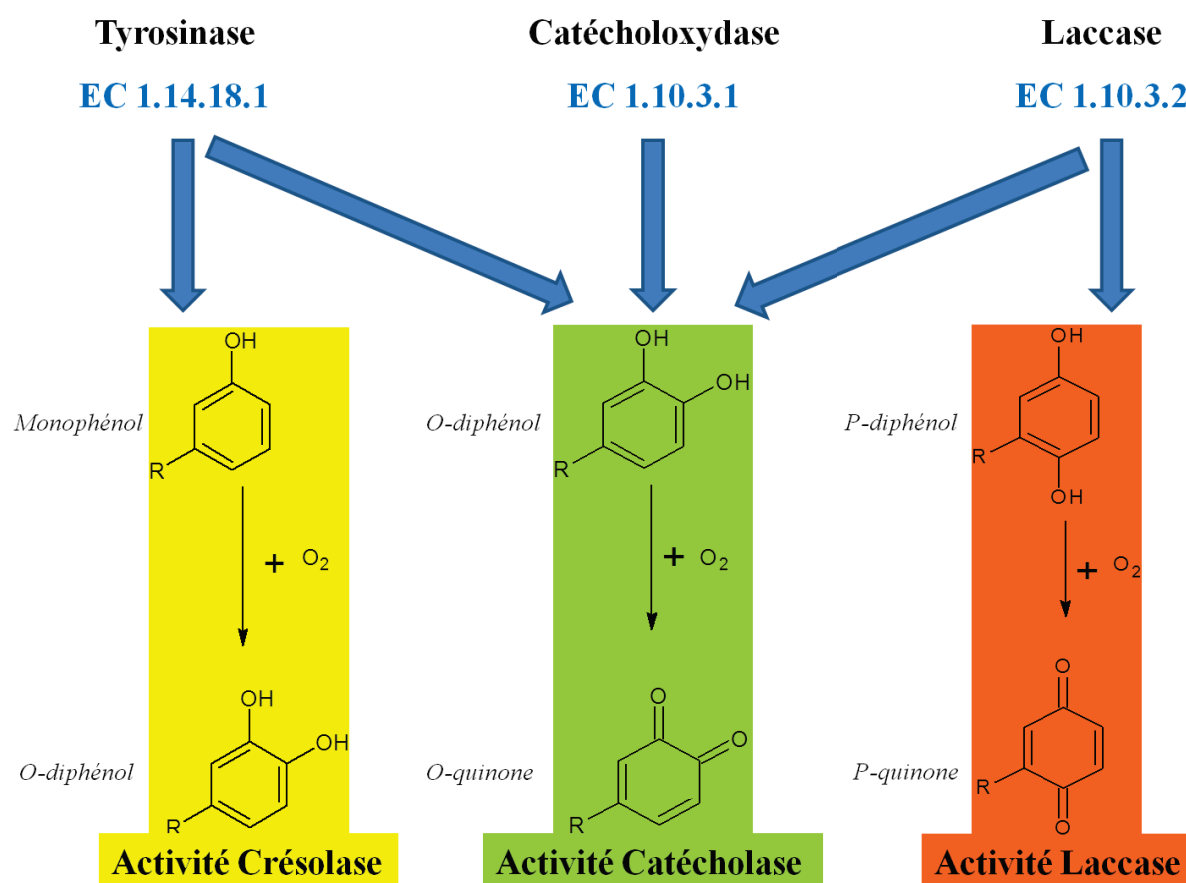


Figure 2. Classification des POs. Modifié d'après Walker & Ferrar (1988). Parmi les 3 sous-classes de POs, les tyrosinases ont des activités crésolase et catécholase, les laccases ont des activités laccase et catécholase et les catéchol oxydases n'ont qu'une activité catécholase.

1. 2. Site actif des POs

L'enzyme se fixe à son substrat, grâce à son site actif qui est une entité tridimensionnelle, occupant généralement, une part relativement faible du volume total de l'enzyme. Une fois le complexe enzyme-substrat formé, les liaisons qui le maintiennent sont relativement faibles car

ce sont la complémentarité des formes tridimensionnelles et le caractère directionnel des liaisons formées qui contribuent au haut degré de spécificité entre une enzyme et un substrat. Les différentes études portant sur le site actif des POs différencient le site actif des laccases, d'une part, du site actif des tyrosinases et catéchol oxydases, d'autre part.

- ✓ Les laccases contiennent généralement 4 ions cuivre. Un premier centre cuivre de type I est lié à deux résidus histidines et au soufre d'un résidu cystéine, ce qui explique la couleur bleue de la protéine (Skálova *et al.*, 2009). Les trois autres ions cuivre forment un groupement cuivre trinucéaire composé d'un ion cuivre de type II et de deux ions cuivre de type III (Yoon *et al.*, 2007). L'activité catalytique du site actif commence par l'oxydation du substrat au niveau du cuivre de type I : 4 molécules de substrat sont oxydées et produisent 4 électrons qui sont ensuite transférés vers le groupement cuivre trinucéaire où une molécule de dioxygène est réduite en eau pour achever le cycle catalytique (Lee *et al.*, 2002).

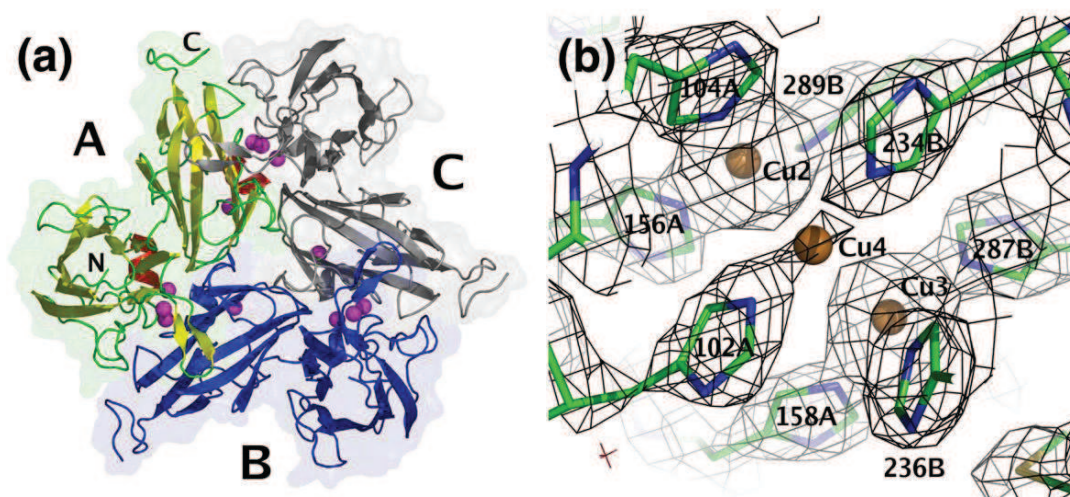


Figure 3. Laccase de *Streptomyces coelicolor*. (a) Vue générale tridimensionnelle d'un trimère de laccase de *S. coelicolor*. Chacune des 3 chaînes sont des unités actives composées d'un ion cuivre de type I et de trois ions cuivre de type II regroupés dans un groupement trinucéaire. Les terminaisons N et C de la chaîne A ont été notées sur la figure. Les 12 ions cuivre sont représentés en violet. (b) Groupement cuivre trinucéaire : les trois ions cuivres (Cu1, Cu2 et Cu3), en marrons, sont représentés liés à leurs résidus histidines (d'après Skálova *et al.*, 2009).

- ✓ Les tyrosinases et les catéchol oxydases possèdent des sites actifs extrêmement proches au niveau structural. Les deux enzymes font partie de la famille des protéines à cuivre de type III, c'est-à-dire composées de deux atomes de cuivre (Cu1 et Cu2), pontés par de

l'oxygène, chacun coordonné par trois résidus histidines. Le mécanisme réactionnel a été étudié et décrit pour les tyrosinases par Matoba et collaborateurs (2006). Dans un premier temps, un ion peroxyde vient former un pont avec les deux atomes de cuivre du site actif pour donner la forme oxydée de l'enzyme. Le groupement hydroxyle du substrat monophénolique perd alors un proton, ce qui va causer la liaison de l'oxygène déprotonisé du monophénol avec l'atome de cuivre Cu2 de l'enzyme. Un carbone ortho du substrat est alors proche de l'ion peroxyde. Un des 2 atomes d'oxygène de l'ion peroxyde va alors venir se fixer au carbone ortho du substrat monophénolique. La réaction monooxygénase se trouve accélérée par la formation d'un intermédiaire stable dans lequel un atome d'oxygène du diphenol nouvellement formé (à partir du monophénol) se lie à l'atome de cuivre Cu1. Pour atteindre cet état intermédiaire, le résidu histidine His54 doit être libéré de sa position initiale sur l'atome de cuivre Cu1. Dans le même temps, ce résidu His54 peut agir comme une base catalytique pour la déprotonation du substrat. L'intermédiaire ainsi formé facilite le transfert des électrons et conduit à la formation de la forme désoxygénée de l'enzyme et de la quinone (Figure 4).

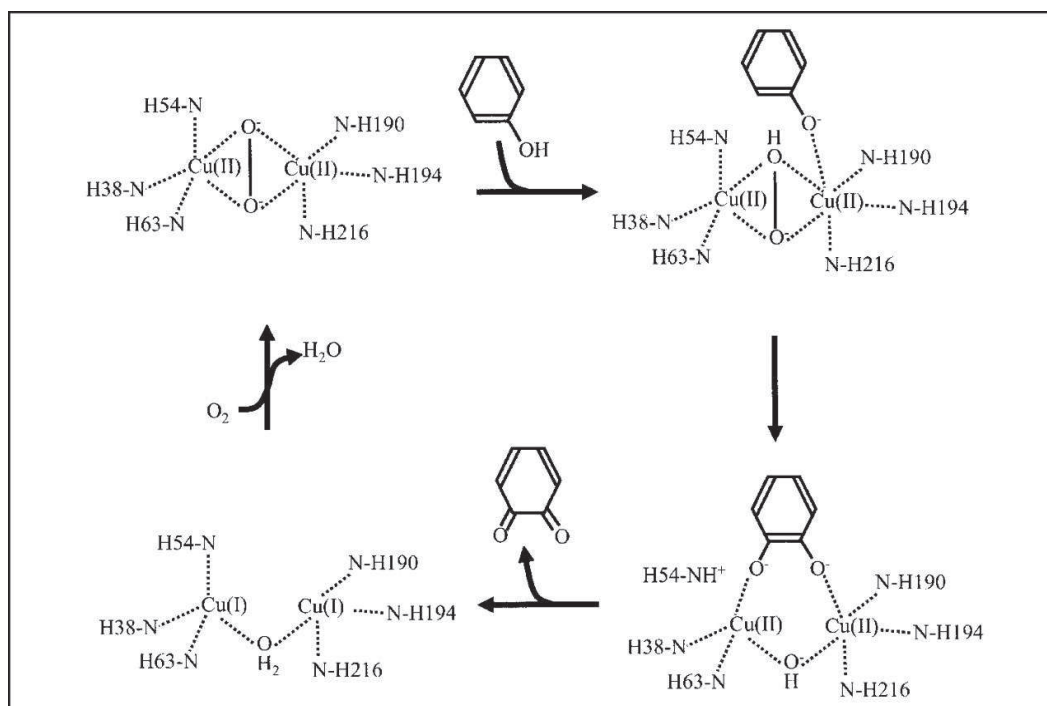


Figure 4. Mécanisme catalytique de la tyrosinase. La forme « oxy » de la tyrosinase catalyse la conversion d'un monophénol en quinone via la formation d'un ortho-diphénol. Les formes « met » et « oxy » de la tyrosinase peuvent catalyser la transformation d'orthodiphénols en quinones correspondants. Cette réaction s'opère de manière similaire à celle des catéchol oxydases (d'après Matoba *et al.*, 2006).

L'orientation des groupements hydroxyles des substrats phénoliques vers le cuivre CuA semble nécessaire à la réaction d'hydroxylation. Si ce cuivre n'est pas accessible, comme c'est le cas dans les catéchol oxydases, par rapport aux tyrosinases, cette voie n'est plus accessible. Les substrats peuvent toujours se fixer au niveau du cuivre CuB mais plus au niveau du second atome de cuivre, ce qui expliquerait pourquoi les catéchol oxydases peuvent oxyder les o-diphénols mais pas les monophénols contrairement aux tyrosinases (Eicken *et al.*, 1999). Bien que la structure du site actif de cette sous-classe ait été moins étudiée que les deux précédentes, il semblerait que l'inaccessibilité du cuivre CuA soit en partie due à une distance plus faible entre les atomes de cuivre par rapport aux tyrosinases (Rompel *et al.*, 1995).

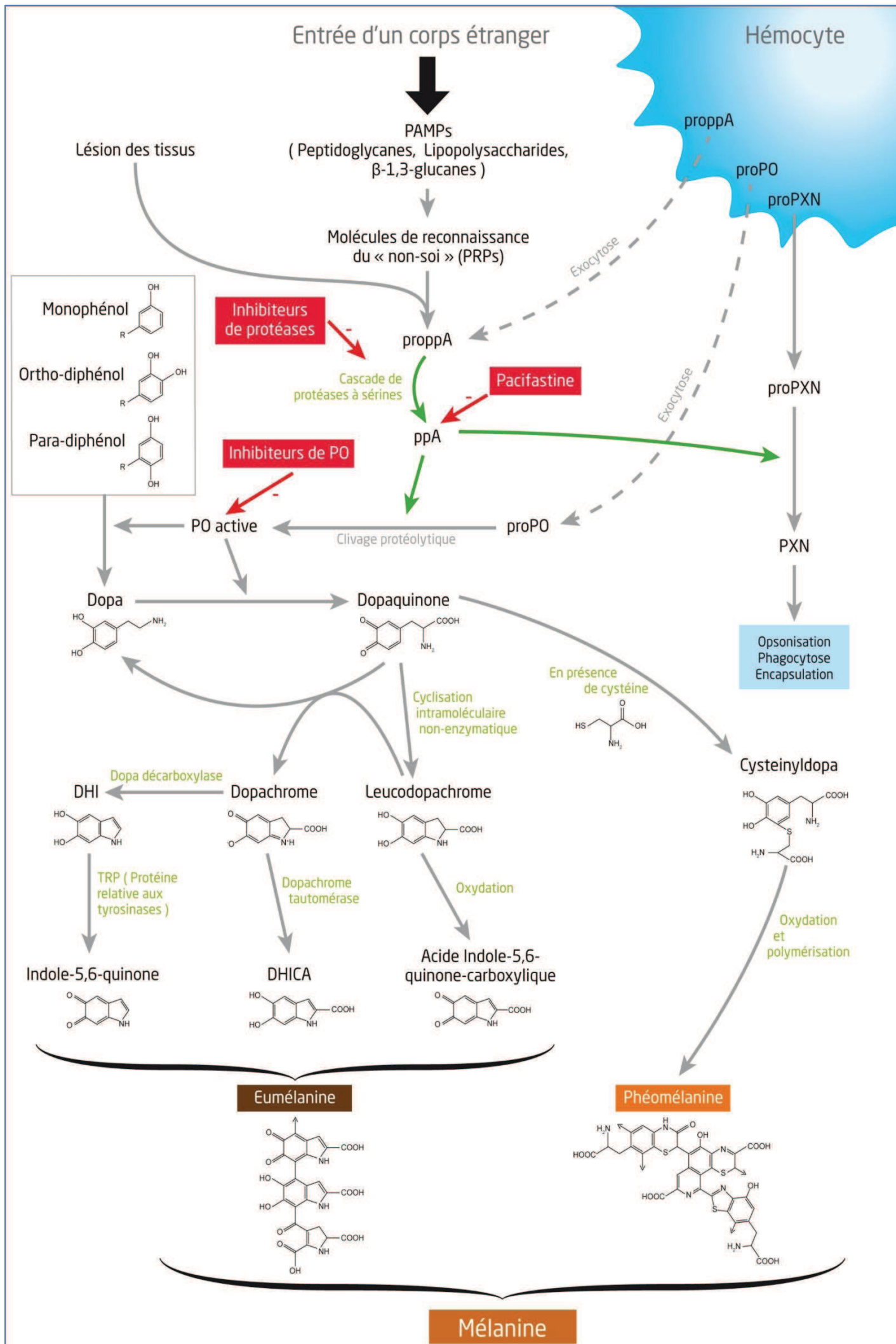
2. Activités POs

2. 1. Activation des POs

L'oxydation des différents types de composés phénoliques et non phénoliques n'est possible que lorsque les POs sont sous leur forme active. Le mécanisme complexe d'activation du zymogène (ou proenzyme) et de régulation spatio-temporelle de l'activité PO au sein de l'organisme a été étudié principalement chez différentes espèces d'arthropodes. La cascade d'activation des prophénoloxydases (proPOs) en POs actives est déclenchée par différents facteurs, notamment l'entrée dans l'organisme d'un corps étranger. En effet, les produits microbiens tels que des motifs moléculaires associés à des pathogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns : PAMPs) vont, une fois présents dans l'organisme, déclencher l'activation de la proPO. Ces PAMPs peuvent être des peptidoglycanes formant les parois bactériennes, des lipopolysaccharides bactériens ou encore des β -1,3-glucanes d'origine fongique (Cerenius *et al.*, 2008). Une lésion des tissus de l'organisme par une action mécanique ou par l'action d'enzymes issues d'un organisme pathogène va également déclencher la cascade d'activation de la proPO (Galko & Krasnow, 2004). Les différentes molécules pénétrant dans l'organisme vont, dans un premier temps, être reconnues comme faisant partie du non-soi et entraîner la libération du zymogène de la PO des cellules hémolymphatiques où elles sont stockées, vers le milieu extracellulaire par exocytose (Johansson & Söderhall, 1985). Cette reconnaissance conduira, dans les heures qui suivent, à la production de peptides antimicrobiens ce qui va activer, non pas la proPO directement, mais le système d'activation de la proPO (proPO-Activating System : proPO-AS) et particulièrement les enzymes d'activation de la prophénoloxydase (prophenoloxidase activating enzyme : ppA). Ces enzymes, initialement

sous leur forme inactive, proppA, dans la fraction acellulaire des fluides, vont être activées par une cascade de protéases à sérine et ce n'est qu'une fois activées que ces enzymes du proPO-AS vont agir sur la proPO pour la rendre active par clivage protéolytique (Kanost *et al.*, 2001 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006 ; Cerenius *et al.*, 2010). Chez l'écrevisse, *Pacifastacus leniusculus*, la production de ces ppA peut être inhibée par une pacifastine, une molécule inhibitrice de protéases (Liang *et al.*, 1997 ; Cerenius *et al.*, 2008). Toutefois, ces protéines n'ont, à ce jour, été trouvées que chez les arthropodes. L'activation de la PO est donc soumise à différents mécanismes de contrôle dont le premier réside dans la reconnaissance spécifique des particules du non-soi par les molécules de reconnaissance de motif (Pattern Recognition Protein : PRPs). Les enzymes du proPO-AS étant activées par une cascade de protéases à sérines, les inhibiteurs de protéases constituent également un élément majeur de la régulation de l'activité PO (Simonet *et al.*, 2002 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Parmi ces inhibiteurs de protéases à sérine, différentes serpins ont été identifiées chez plusieurs espèces comme participant activement à l'inhibition de l'activation de la PO (De Gregorio *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 2003 ; Kanost *et al.*, 2004 ; Nappi *et al.*, 2005). Différents composés d'origine bactérienne ont également été identifiés comme des inhibiteurs de l'activation de la PO (Liang *et al.*, 1997 ; Cerenius & Söderhall, 2004 ; Eleftherianos *et al.*, 2007). Un autre moyen de contrôler l'activité PO est la présence d'inhibiteurs, non pas des enzymes du proPO-AS mais des PO en elles-mêmes. A partir des différentes études portant sur le système PO, principalement chez les insectes et les crustacés, un schéma de synthèse a pu être élaboré de l'entrée d'un corps étranger à la synthèse de la mélanine (Figure 5).

Figure 5. Schéma de synthèse du système PO depuis l'entrée d'un corps étranger jusqu'à la formation de la mélanine. Schéma principalement conçu à partir des connaissances acquises chez les insectes et les crustacés (Johansson et Söderhäll, 1985 ; Sugumaran, 1991 ; Wilczek & Mishima, 1995 ; Riley, 1997 ; Liang *et al.*, 1997 ; Söderhäll et Cerenius, 1998 ; Kanost *et al.*, 2001 ; Simonet *et al.*, 2002 ; De Gregorio *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 2003 ; Kanost *et al.*, 2004 ; Nappi *et al.*, 2005 ; Christensen *et al.*, 2005 ; Kim & Uyama, 2005 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2007 ; Cerenius *et al.*, 2008, 2010 ; Roulin *et al.*, 2011). Les différents mécanismes de rétrocontrôles ne sont pas représentés sur le schéma.



2. 2. POs et péroxinectines

Il a été démontré chez les crustacés que l'action de la ppA, enzyme appartenant au proPO-AS, ne se répercute pas uniquement sur la proPO mais aussi sur la péroxinectine (PXN). Cette enzyme, qui agit comme un facteur d'activation de dégranulation et d'encapsulation, présente des activités de peroxydase, d'adhésion cellulaire et d'opsonisation (Johansson & Söderhall, 1989 ; Johansson *et al.*, 1995 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Stockée dans les hémocytes sous forme inactive (proPXN), elle va être libérée dans le milieu extracellulaire dès lors qu'un corps étranger sera détecté par les protéines de reconnaissance (PRPs). C'est ensuite la ppA qui va transformer le zymogène en sa forme active (Cerenius *et al.*, 2008), laquelle va alors favoriser l'opsonisation, la phagocytose ou l'encapsulation du corps étranger et donc son élimination. L'activité inhibitrice des pacifastines sur la ppA a un impact direct sur l'activité de la PXN puisque l'inactivation des pacifastines peut entraîner d'une part, une augmentation de l'activation de la proPO, donc de l'activité PO, et d'autre part, une augmentation de l'activité PXN, donc de l'élimination de l'organisme pathogène (Liu *et al.*, 2007). Par ailleurs, la PXN est associée à une superoxyde dismutase (SOD) et à une intégrine (Johansson *et al.*, 1999 ; Cerenius *et al.*, 2008). Aussi, la péroxinectine pourrait, à partir du peroxyde d'hydrogène résultant de l'activité SOD, produire de l'acide hypohalique fonctionnant alors comme un système microbicide luttant contre l'invasion de microorganismes (Sritunyalucksana *et al.*, 2001 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

2. 3. Les produits de réaction des POs

L'oxydation des différents substrats des 3 sous-classes de POs va aboutir à la formation d'o-diphénols ou d'o-quinones pour les tyrosinases, d'o-quinones ou de p-quinones pour les laccases, et d'o-quinones pour les catéchol oxydases. Les connaissances sur le devenir de ces composés et les mécanismes de mélanisation qui en découlent sont principalement issues d'études portant sur les insectes (Christensen *et al.*, 2005). L'oxydation des composés phénoliques par les POs va aboutir à la formation de dopa (activité monophénoloxydase) puis de dopaquinones (activité diphénoloxydase). En présence de cystéine (et plus largement de composés thiols), les dopaquinones vont être transformés en cystéinyldopa qui vont à leur tour subir une oxydation puis une polymérisation. Le composé alors obtenu est la phéomélanine, composé de couleur jaune à rouge. C'est l'un des deux constituants de la mélanine (Roulin *et al.*, 2011). En l'absence de composés thiols, la dopaquinone peut subir une cyclisation intramoléculaire non-enzymatique et être alors transformée en leucodopachrome qui peut lui-même être oxydé en acide indole-5,6-quinone-carboxylique. Le

leucodopachrome peut également, parallèlement à la transformation de dopaquinone en dopa, être transformé en dopachrome. Ce dopachrome peut alors subir l'action d'une dopa décarboxylase et être transformé en 5,6-dihydroxyindole (DHI) puis en indole-5,6-quinone via l'action d'une enzyme, la Tyrosinase Related Protein (TRP). Le dopachrome peut également subir l'action d'une dopachrome tautomérase et être transformé en acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA). Ainsi, trois molécules peuvent être formées à partir du leucodopachrome : de l'indole-5,6-quinone, du DHICA et de l'acide indole-5,6-quinone-carboxylique. L'ensemble de ces 3 molécules constitue l'eumélanine dont la couleur varie du brun au noir. La composition de cette eumélanine sera directement influencée par le rapport DHICA/DHI, et donc par l'activité de la dopachrome tautomérase (Wilczek & Mishima, 1995). Ce qui est communément appelé mélanine est un mélange de phéomélanine et d'eumélanine (Roulin *et al.*, 2011).

2. 4. POs et hémocyanines

Les tyrosinases et les catéchol oxydases appartiennent à la famille des métalloprotéines contenant un site actif à deux atomes de cuivre. Au sein de cette famille se trouvent également les hémocyanines de mollusques et d'arthropodes (Decker & Tuczec, 2000). Alors que le rôle premier des tyrosinases et catéchol oxydases est la catalyse de composés phénoliques, le rôle principal des hémocyanines est de transporter l'oxygène au sein de l'organisme (Campello *et al.*, 2008). Chez ces 3 types de protéines, l'oxygène se lie aux 2 atomes de cuivre formant le site actif, et chaque atome de cuivre est lié à 3 résidus histidine. Les hémocyanines transportent l'oxygène sans le transformer alors que les catéchol oxydases et les tyrosinases utilisent l'oxygène et le transforment afin de réaliser l'oxydation de substrats phénoliques (Decker & Terwilliger, 2000). Différentes études, au niveau spectroscopique, cristallographique et au niveau de l'alignement des séquences suggèrent que ces enzymes ont une histoire évolutive commune tant leurs sites actifs sont proches (Solomon *et al.*, 1996 ; Eicken *et al.*, 1999 ; Decker & Terwilliger, 2000). Une séquence a notamment été identifiée et retrouvée chez ces différentes protéines, dans les régions contenant les résidus histidine qui ont pour point commun, chez les hémocyanines et les POs, de participer à la fixation des atomes de cuivre au sein de la protéine (Van Holde *et al.*, 2001). Chez les arthropodes, des séquences de tyrosinases ont été étudiées et se sont avérées proches des séquences d'hémocyanines bien qu'il s'agisse de gènes différents (Aspán *et al.*, 1995 ; Fujimoto *et al.*, 1995). Bien que les différences entre ces hémocyanines et ces deux sous classes de POs existent tant au niveau de la taille, des structures primaire, tertiaire et quaternaire que des

fonctions physiologiques, les activités enzymatiques peuvent être similaires. En effet, plusieurs études mettent en avant une activité phénoloxydase des hémocyanines chez différentes espèces de mollusques et d'arthropodes (Beltramini *et al.*, 1990 ; Decker & Rimke, 1998 ; Salvato *et al.*, 1998 ; Decker & Jaenicke, 2004 ; Siddiqui *et al.*, 2006 ; Guo *et al.*, 2009 ; Ballarin *et al.*, 2012 ; Idakieva *et al.*, 2013). Cette activité PO-like des hémocyanines est particulièrement intéressante à étudier chez des espèces ne possédant pas de PO mais uniquement une activité PO issue des hémocyanines (Jaenicke *et al.*, 2009). La complémentarité de ces deux types de protéines que sont les hémocyanines et les POs pourrait également avoir un intérêt chez des espèces ne possédant pas d'hémocyanines et plus largement pas de protéine transporteuse d'oxygène comme c'est le cas chez la palourde japonaise *Venerupis philippinarum*. En effet, chez les mollusques bivalves, seules les espèces appartenant à la sous-classe des protobranches possèdent des hémocyanines (Morse *et al.*, 1986). Il ne faut pas non plus omettre le fait que certaines espèces de mollusques et d'annélides ne possèdent pas d'hémocyanines mais des hémoglobines comme c'est le cas chez *Arenicola cristata*, *Scapharca inaequivalvis*, *Lumbricus terrestris*, *Anadora broughtonii* ou encore *A. satowi* (Shlom & Vinogradov, 1973 ; Waxman, 1975 ; Petruzzelli *et al.*, 1985).

3. POs et mélanisation

Les mélanines, mélange de phéomélanines et d'eumélanines, sont présentes chez les animaux et les végétaux et représentent une classe importante de pigments biologiques (Prota, 1992). Ces biopolymères sont notamment caractérisés par une coloration sombre, une faible solubilité, une résistance à l'hydrolyse et une absence de régularité au niveau moléculaire principalement due aux diverses formes de quinones qui les composent et aux différentes liaisons entre celles-ci (Lambert *et al.*, 1989). Bien souvent, le terme de mélanine fait allusion à la mélanine en elle-même mais aussi, par abus de langage, à ses dérivés et aux quinones qui la composent (Césarini, 1996, Riley, 1997). Aujourd'hui encore, la mélanogénèse est l'un des mécanismes les plus universels mais en même temps l'un des plus énigmatiques des adaptations des organismes vivants aux conditions de vie variables sur Terre (Plonka & Grabacka, 2006). En effet, à ce jour, aucun consensus n'a été trouvé quant à la fonction primaire ou principale de cette biosynthèse tant ses rôles sont divers.

3. 1. Rôle de photoprotection

La mélanine possède la propriété d'avoir un très large spectre d'absorption. En effet, du fait d'un haut degré de conjugaison au sein de la molécule, la mélanine absorbe une grande partie du spectre de la lumière visible mais aussi une partie du rayonnement ultraviolet (UV) et

infrarouge (Riley, 1997). La mélanine, et plus particulièrement les quinones constituant l'eumélanine, vont absorber les radiations et réagir avec les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (EROs) qui accompagnent le stress oxydatif (Rózanowska *et al.*, 1999 ; Boulton *et al.*, 2001). Les quinones sont des composés relativement instables et toxiques qui vont facilement réagir avec les EROs par des réactions d'oxydation et de réduction pour aboutir à la formation de molécules non toxiques pour la cellule (Sarna *et al.*, 1986). Ce rôle photoprotecteur de la mélanine a largement été étudié chez l'Homme chez qui la mélanine est responsable notamment de la coloration de la peau et des cheveux et est le pigment principal des surfaces de structure des vertébrés (Riley, 1997). La mélanine va protéger les cellules, et plus précisément le contenu génétique de celles-ci des radiations reçues. Chez l'Homme, plusieurs études mettent en avant le fait que les peaux noires sont davantage protégées des radiations que les peaux claires puisque la mélanine y est produite en plus grande quantité et davantage concentrée sur les couches de surface de l'épiderme (Césarini, 1996). Ce que l'on appelle communément le « bronzage » est considéré comme une protection contre les UV puisque l'exposition à ces derniers va stimuler la production d'eumélanine et de phéomélanine. L'exposition de la phéomélanine aux rayons UV va, en présence d'oxygène, conduire à la production d'espèces radicalaires délétères pour la cellule alors que l'eumélanine, exposée aux UV, va quant à elle réagir avec ces espèces radicalaires et les désactiver. Ainsi les mélanocytes stimulés par l'exposition aux UV et à la chaleur vont proliférer et produire davantage de mélanine (Nakazawa *et al.*, 1998). La mélanine peut donc être photoprotectrice ou phototoxique en fonction du ratio entre phéomélanine et eumélanine (Seagle *et al.*, 2005). Chez les personnes rousses, le ratio eumélanine/ phéomélanine est particulièrement bas, ce qui rend leur peau très sensible aux radiations solaires et qui se traduit par des taux de cancer de la peau significativement plus élevés (Césarini, 1996 ; Slominski *et al.*, 2005). Associée à ses capacités d'absorption des radiations et de photoprotection, la mélanine joue également un rôle de thermorégulateur puisque l'énergie reçue par la mélanine va être convertie en chaleur et dispersée à travers les réseaux vasculaires du système pileux (Césarini, 1996 ; Van Neste & Tobin, 2004). La mélanine est également associée aux processus de changement de couleur qui peuvent se produire au cours du dimorphisme sexuel ou encore des processus de camouflage. Ce phénomène est notamment étudié chez les poissons plats qui prennent la couleur du fond sur lequel ils se trouvent pour se protéger des prédateurs mais aussi pour chasser à l'affut sans être repéré par les proies. Récemment, deux hormones entraînant la concentration de la mélanine ont été caractérisées chez le flet étoilé (Kang & Kim, 2013).

3. 2. Rôle Structural

Les produits de réaction des POs et la mélanine, au sens large, possèdent également un rôle structural au sein des organismes. Ce rôle de la mélanine a notamment été étudié chez les plantes où la mélanine participe à la rigidification des tissus tels que les graines ou les gousses (Riley, 1997). Cette rigidification permet notamment à ces organismes d'assurer leur dispersion via la production de graines indurées et donc résistante aux contraintes biotiques et/ou abiotiques qu'elles peuvent subir (Howe & Smallwood, 1982). Le rôle structural de la mélanine et de ses dérivés a également été largement étudié chez les arthropodes et plus particulièrement chez les insectes qui ne possèdent pas de squelette interne comme les mammifères mais un exosquelette. Afin de protéger le corps mou de ces espèces, cet exosquelette est induré par un processus appelé sclérotinisation qui est très proche et lié au processus de mélanisation (Sugumaran, 1991 ; Suderman *et al.*, 2006 ; Andersen, 2010). Chez les insectes, deux sous-classes de POs ont été mises en avant au cours de la sclérotinisation : les tyrosinases et les laccases (Andersen, 2010) qui vont oxyder les composés phénoliques pour aboutir à la formation de quinones. Chez les insectes, les principaux composés phénoliques sur lesquels les POs vont agir sont des o-diphénols : la N-acétyl-dopamine (NADA) et la N-beta-alanyl dopamine (NBAD). Les différentes o-quinones ainsi formées peuvent ensuite subir différentes isomérisations puis spontanément se lier à des groupes nucléophiles libres de différentes protéines et de chitine par réticulation (Suderman *et al.*, 2006). Ces différentes réactions vont avoir pour conséquence de rendre insolubles les protéines modifiées (Suderman *et al.*, 2006) et vont s'accompagner d'une déshydratation importante de la cuticule nouvellement formée, ce qui va contribuer au durcissement de celle-ci (Andersen, 1981 ; Wappner & Quesada-Allué, 1996). En fonction des espèces et de leur stade de développement, les laccases et les tyrosinases sont impliquées différemment dans le processus de sclérotinisation. Ainsi, les laccases sont les seules POs détectées dans la cuticule de criquet (Andersen, 1978) alors que chez le sphinx du tabac, *Manduca sexta*, les deux sous-classes de POs sont présentes au niveau de la cuticule (Thomas *et al.*, 1989 ; Morgan *et al.*, 1990). Plusieurs études suggèrent que seules les laccases sont impliquées dans la sclérotinisation et que les tyrosinases jouent davantage un rôle de défense immunitaire au cours de ce processus (Barrett & Andersen, 1981 ; Andersen *et al.*, 1996 ; Arakane *et al.*, 2005). Cette hypothèse est appuyée par l'activation de protyrosinases dans la cuticule lorsque celle-ci est endommagée (Lai-Fook, 1966) mais aussi par le fait que l'activité laccase augmente significativement au moment de la sclérotinisation et redescend à un niveau relativement faible dès lors que le processus est terminé (Barrett, 1991). Au cours de la mue,

ces espèces vont perdre leur cuticule et en reconstruire une nouvelle plus grande. La cuticule nouvellement formée apparaît dans un premier temps molle et claire. Puis, très rapidement, celle-ci va s'indurer et parallèlement s'assombrir ce qui confirme le fait que l'induration de l'exosquelette et la mélanisation sont liées (Sugumaran, 1991). Cependant, les travaux menés sur des insectes albinos présentant une cuticule indurée prouvent que bien que ces deux voies peuvent se dérouler indépendamment (Malek, 1957 ; Karlson & Sekeris, 1962 ; Andersen *et al.*, 1996) malgré le fait qu'elles partagent certaines voies enzymatiques et certains intermédiaires réactionnels (Andersen, 2010).

3. 3. Rôle de chémoprotection

La mélanine peut également être considérée comme un pigment chémoprotecteur en agissant comme un piège à radicaux libres (Schiel *et al.*, 1987) ou comme un moyen de se lier et d'inactiver des cations toxiques et notamment les métaux (Riley, 1997). Ce rôle chémoprotecteur de la mélanine est particulièrement étudié chez l'Homme puisque celui-ci est directement lié à la maladie de Parkinson. En effet, chez l'Homme, les neurones dopaminergiques, qui forment la substance noire du cerveau (*substantia nigra*) synthétisent de la neuromélanine dont la structure est similaire à celle de la mélanine cutanée (Lillie, 1955 ; 1957). Chez l'homme, la concentration en neuromélanine va augmenter au cours de la vie jusqu'à la soixantaine, puis par la suite, la concentration en neuromélanine va diminuer (Mann & Yates, 1974). Chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, on observe une diminution significative de la concentration en neuromélanine au sein de la substance noire du cerveau, traduisant une perte de neurones dopaminergiques (Gibb *et al.*, 1990 ; Pakkenberg *et al.*, 1991). Une corrélation inverse entre la quantité de neuromélanine dans les neurones dopaminergiques et la vulnérabilité de ces cellules à la maladie de Parkinson a été mise en avant (Hirsch *et al.*, 1988). Cette corrélation peut être expliquée par la fonction chémoprotectrice de la neuromélanine puisque celle-ci est capable de se lier à différents métaux et particulièrement aux cations toxiques parmi lesquels le fer, le zinc, le cuivre ou encore le manganèse (Zecca *et al.*, 2002). Cette séquestration, de la part de la neuromélanine, des cations toxiques participe à la lutte contre la peroxydation lipidique et à la protection contre les radicaux libres (Youdim *et al.*, 1994 ; Korytowski *et al.*, 1995). Ainsi, une réduction de la quantité de neuromélanine, chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, va se traduire par une activité rédox plus importante et une plus grande susceptibilité aux dommages oxydatifs (Faucheux *et al.*, 2003). Différentes études ont mis en avant une accumulation de fer au sein de la substance noire de patients atteints de la maladie

de Parkinson (Sofic *et al.*, 1988 ; Riederer *et al.*, 1989 ; Jellinger *et al.*, 1990 ; Mann *et al.*, 1994 ; Becker *et al.*, 1995). Au-delà d'un certain seuil, la neuromélanine est saturée en fer et n'est plus capable de se lier au fer, il va alors s'en suivre une production de radicaux libres cytotoxiques (Zaręba *et al.*, 1995). De plus la production de peroxydes d'hydrogène va dégrader la neuromélanine et entraîner une libération de fer et d'autres métaux toxiques ce qui va accélérer la mort des neurones dopaminergiques (Shima *et al.*, 1997). Les études actuelles qui tentent de comprendre les mécanismes mis en place au cours du développement de la maladie de Parkinson s'intéressent particulièrement à la formation de la neuromélanine et à l'action de la tyrosinase présente chez l'Homme. Actuellement la L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) est utilisée dans différents traitements contre la maladie de Parkinson et d'autres substrats potentiels de la tyrosinase sont recherchés afin de compenser les baisses de neuromélanine symptomatiques de cette maladie (Gurme *et al.*, 2013 ; Yildiz *et al.*, 2013).

3. 4. Applications biotechnologiques

En dehors de la recherche fondamentale, les phénoloxydases sont également étudiées dans différents secteurs industriels. Le premier d'entre eux est le secteur agroalimentaire où l'activité des phénoloxydases est responsable du brunissement enzymatique des denrées alimentaires telles que les fruits, les légumes, les fruits de mer ou encore les champignons (Luo et Barbosa., 1997 ; Artes *et al.*, 1998 ; Jolivet *et al.*, 1998). Ce brunissement a pour conséquences une baisse des qualités organoleptiques et visuelles des produits mais surtout une chute de la valeur marchande, voire une exclusion du marché (McEvily *et al.*, 1992). Pour contrer ces réactions enzymatiques, les industriels recherchent différents inhibiteurs de phénoloxydases pouvant servir à la conservation et/ou au maintien des différentes denrées après leur récolte ou leur capture dans le cas des crustacés, sans que ces inhibiteurs ne représentent un danger pour la consommation humaine. Ainsi, différents inhibiteurs ont été testés pour inhiber l'activité tyrosinase des champignons de Paris, *Agaricus bisporus* (McCord & Kilara, 1983 ; Shi *et al.*, 2005). Un autre procédé visant à réduire ce brunissement des denrées consiste en un conditionnement en atmosphère anaérobie puisque le dioxygène est nécessaire à l'activité des phénoloxydases (Whitaker & Lee., 1995). Le 4-hexylresorcinol est, par exemple, un inhibiteur qui ressort de plusieurs études comme un inhibiteur efficace pour lutter contre le brunissement enzymatique des crevettes (Lambrecht, 1995), des pommes (Luo & Barbosa-Cánovas, 1995) ou encore des champignons (Dawley & Flurkey, 1993).

Les phénoloxydases sont également étudiées et utilisées dans les milieux pharmaceutiques et cosmétiques. Des laccases de *Trametes sp* ont ainsi été utilisées pour synthétiser de nouveaux antibiotiques tels que de nouvelles pénicillines (Mikolasch *et al.*, 2006). Ces enzymes sont également présentes dans les teintures pour cheveux au sein desquelles elles remplacent le peroxyde d'hydrogène, lorsque celui-ci est utilisé comme agent oxydant, car elles sont considérées comme moins irritantes que ce dernier (Aaslyng *et al.*, 1996 ; Lang & Cotteret, 1999) et font, de ce fait, l'objet de différents brevets. A l'inverse, pour la préparations de crèmes pour le blanchiment de la peau, ce sont des inhibiteurs de phénoloxydases qui sont recherchés et utilisés afin d'inhiber l'activité des mélanocytes (Golz-Berner *et al.*, 2004). Pour la décoloration de matières textiles et le blanchiment de celles-ci, des produits à base de laccases sont utilisés pour leur potentiel de dégradation des colorants chimiques de nature synthétique couramment utilisés dans l'industrie (Rodríguez Couto *et al.*, 2004, 2005).

Les POs, et particulièrement les laccases, sont également exploitées pour la bioremédiation des sols puisqu'elles sont capable de dégrader des composés tels que le 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), extrêmement dangereux pour l'environnement (Durán & Esposito, 2000). D'autres composés toxiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Polycyclic aromatic hydrocarbons : PAHs) issus de l'utilisation de combustibles fossiles, ou encore les isoxaflutoles utilisés en agriculture comme herbicides peuvent être dégradés par l'action des laccases (Durán & Esposito, 2000 ; Pointing, 2001 ; Bollag *et al.*, 2003).

Les applications biotechnologiques des POs présentées ici ne constituent pas un inventaire exhaustif. Les capacités des POs à transformer un grand nombre de composés synthétiques ou non, souvent fortement toxiques pour les espèces animales et végétales et pour l'environnement, ouvrent d'importantes perspectives d'utilisation de ces enzymes.

4. POs et système immunitaire des invertébrés

L'activité PO a été et continue d'être au centre de nombreuses études chez les vertébrés du fait de leur rôle précurseur dans la synthèse de mélanine. Chez l'Homme, par exemple, les recherches médicales traitant de pathologies telles que les cancers de la peau ou la maladie de Parkinson s'intéressent particulièrement aux POs pour comprendre les mécanismes mis en place au cours du développement de ces maladies. Chez les invertébrés, le système immunitaire est différent de celui des vertébrés mais les POs y sont également présentes et leur rôle immunitaire y est étudié. L'immunité est définie, au sens biologique, comme un état de résistance d'un organisme à la pénétration ou à la présence d'agents extérieurs (Du

Pasquier, 2001). Par extension, le système immunitaire peut alors être défini comme l'ensemble des composants et des mécanismes mis en place par un organisme pour se protéger de l'invasion de microorganismes, de virus, de parasites mais aussi de cellules d'individus de la même espèce. L'état de résistance doit cependant être différencié de celui de tolérance : l'hôte tolère la présence d'une espèce étrangère mais doit limiter le coût énergétique de la présence de celle-ci (Perru, 2006 ; Ayres & Schneider, 2008). Le cas des symbioses illustre parfaitement cet état de tolérance (McFall-Ngai *et al.*, 2010 ; Hird, 2010). Une exigence incontournable à l'existence d'un système immunitaire est la discrimination entre le soi et le non-soi qui est la première étape d'une réaction immunitaire et qui a été largement étudiée (Du Pasquier, 2001 ; Hoebe *et al.*, 2004). Dès lors, une réponse immunitaire va se mettre en place et résulter en une cascade de multiples réactions convergentes dont l'aboutissement, dans le meilleur des cas, sera l'élimination du « signal » ayant déclenché la réaction de reconnaissance du non-soi (Du Pasquier, 2001). La reconnaissance du non-soi est basée sur un système de récepteurs parmi lesquels les récepteurs NOD (Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins), les récepteurs de type Toll (Toll-Like Receptors : TLR) ou encore les lectines. Ces différents types de récepteurs innés sont capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen-Associated Molecular Patterns : PAMPs) tels que les lipopolysaccharides bactériens (LPS), les peptidoglycanes (PGN) ou encore les β 1,3-glucanes (Janeway Jr & Medzhitov, 2002 ; Cerenius & Söderhall, 2004 ; Royet, 2004 ; Park *et al.*, 2007). Chez les crustacés, et particulièrement chez *Pacifastacus leniusculus*, les récepteurs à β 1,3-glucanes ont été caractérisés et leur implication directe dans l'activation du système PO et dans l'excrétion des proPOs depuis les hémocytes vers le sérum ont été décrits (Duvic & Söderhäll, 1990, 1992 ; Lee *et al.*, 2000).

4. 1. Immunité humorale, immunité cellulaire

Communément, on distingue le système immunitaire inné ou naturel ou non spécifique, du système immunitaire acquis ou adaptatif ou spécifique. Chez les organismes invertébrés, la réponse immunitaire est uniquement innée puisqu'il n'y a, chez ces espèces, pas de production d'anticorps. La réponse immunitaire n'est donc, à priori, pas spécifique et il n'y a donc pas de mémoire immunitaire. Cela dit, ces concepts d'absence de spécificité et de mémoire immunitaire chez les invertébrés sont de plus en plus remis en cause et bien que la mémoire immunitaire des invertébrés soit d'un niveau bien différent de celui conféré aux vertébrés par les systèmes d'anticorps/antigènes, elle serait bien présente et fonctionnelle chez

différentes espèces (Kurtz, 2004; Kurtz & Franz, 2003; Bailey *et al.*, 2013). La spécificité immunitaire, quant à elle, malgré une diversité génétique de l'immunité limitée est réelle et se traduit notamment par les différents types de récepteurs qui autorisent, par exemple, la différenciation entre des bactéries Gram négatives et des bactéries Gram positives (Ulevitch & Tobias, 1999 ; Yoshimura *et al.*, 1999 ; Kurtz, 2005 ; Sadd & Schmid-Hempel, 2006 ; Schulenburg *et al.*, 2007 ; Netea *et al.*, 2011). Quoi qu'il en soit, la réponse immunitaire innée repose sur deux types de réactions : *l'immunité à médiation cellulaire*, c'est-à-dire basée sur l'action des hémocytes et *l'immunité à médiation humorale*, c'est-à-dire basée sur la fraction acellulaire des fluides des organismes (Gillespie *et al.*, 1997). Chez les invertébrés, ces deux composantes de l'immunité, sont présentes au sein de l'hémolymph circulant et des autres fluides.

L'immunité à médiation cellulaire : elle repose principalement sur les hémocytes, cellules de l'hémolymph et des fluides présentant une grande diversité de forme mais aussi de fonctions. Deux groupes d'hémocytes sont généralement différenciés : les granulocytes et les hyalinocytes (Cheng, 1981, 1984). Les fonctions de ces cellules ne s'arrêtent pas à l'immunité puisqu'elles interviennent également dans le transport et l'excrétion des nutriments, la digestion ou encore la réparation coquillière. Ces cellules sont capables de réaliser la phagocytose (Figure 6), processus clé de la défense immunitaire des invertébrés (Noel *et al.*, 1993). Dans un premier temps, les hémocytes sont attirés par les particules étrangères : on parle alors de chimiotactisme (Howland & Cheng, 1982). Les hémocytes vont alors reconnaître ces particules comme faisant partie du non-soi via des interactions membranaires (Lavine & Strand, 2002 ; Canesi *et al.*, 2002). Cette reconnaissance entraîne la formation de pseudopodes qui vont se fixer à la particule à phagocyter et l'englober jusqu'à l'internaliser. Une fois internalisée, cette particule étrangère sera isolée dans une membrane phospholipidique qui constitue le phagosome, lequel va fusionner avec le lysosome pour donner le phagolysosome. Le lysosome contient tout le matériel nécessaire à la destruction d'une particule étrangère et notamment les enzymes lysosomiales qui peuvent varier d'une espèce à une autre (Bachère *et al.*, 1995). Dans le cas où la particule étrangère s'avère trop volumineuse pour être phagocytée, celle-ci va être encerclée par les hémocytes qui vont alors produire des fibres formant une capsule fine autour du corps étranger (Fisher, 1986). Les enzymes lysosomiales ne sont pas les seules à œuvrer à la destruction des particules étrangères puisque le processus de poussée respiratoire va conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO = Reactive Oxygen Species) (Klebanoff, 1982). Ces espèces réactives de l'oxygène, particulièrement instables, vont former un microenvironnement

fortement oxydant et donc toxique pour la particule étrangère. Des espèces réactives de l'azote, tels que l'oxyde nitrique, peuvent également être produites et s'avèrent, tout comme les espèces réactives de l'oxygène, très instables et bactéricides (Rivero, 2006).

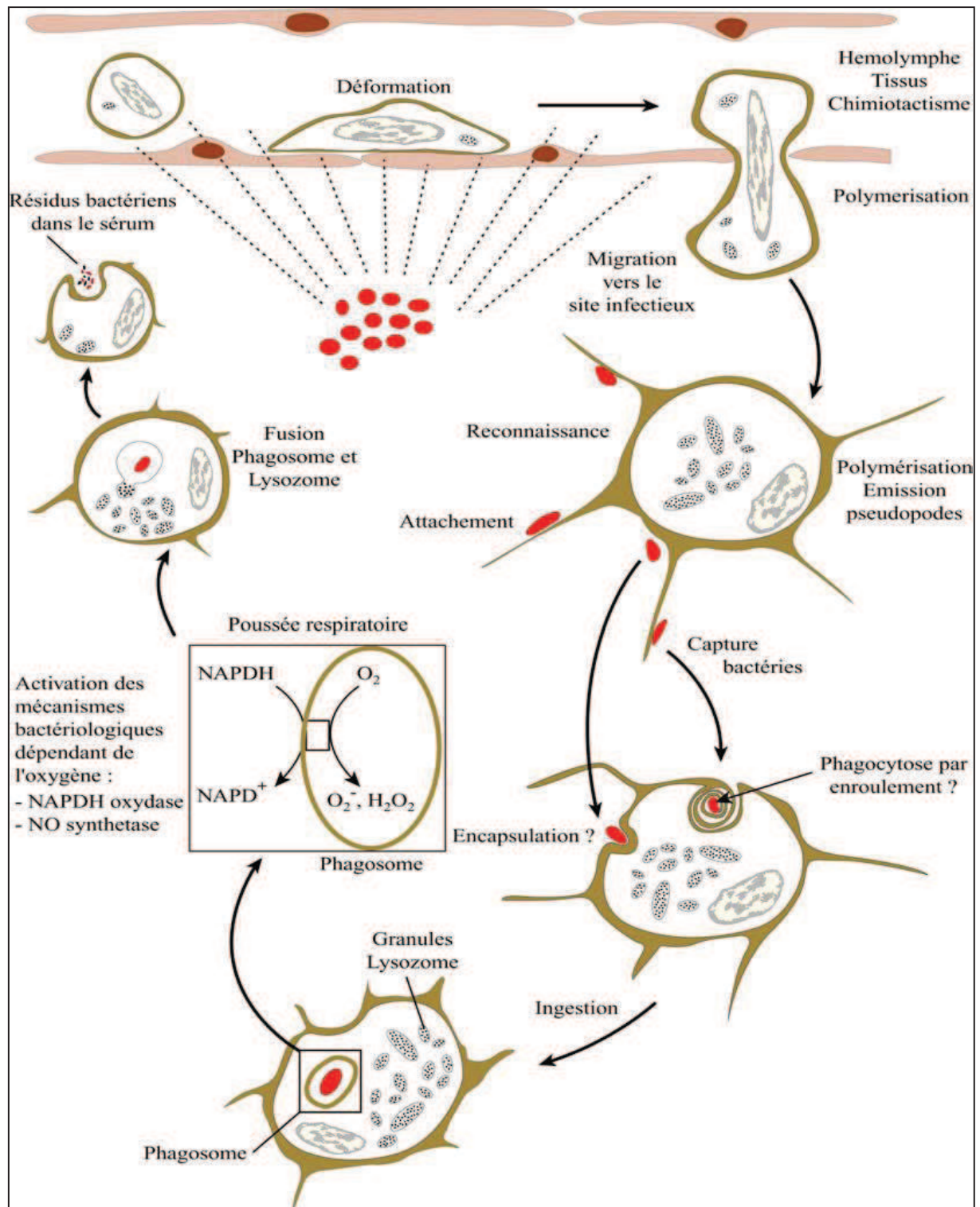


Figure 6. Schéma de synthèse des processus de phagocytose de microorganismes (représentés en rouge) par des cellules hématocytaires. D'après Paillard, 2004a.

L'immunité à médiation humorale : les facteurs humoraux sont, pour certains, directement liés à l'immunité à médiation cellulaire étant donné le fait que certains d'entre eux sont directement produits par les hémocytes puis « déversés » dans l'hémolymph. Parmi les facteurs humoraux se trouvent notamment des enzymes lysosomiales parmi lesquelles le lysozyme (Chu, 1988). Des peptides anti-microbiens, des molécules cytotoxiques et/ou antivirales font également partie des facteurs humoraux. Des enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase ou la superoxyde dismutase mais aussi la NO synthase sont également présentes dans l'hémolymph circulant. Les phénoloxydases peuvent être considérées comme faisant partie à la fois de l'immunité cellulaire - étant donné le fait que la forme inactive (proPO) est stockée dans les hémocytes - et à la fois de l'immunité humorale - puisqu'elles sont activées une fois dans l'hémolymph -, ce qui rend la régulation du système phénoloxydase d'autant plus complexe.

4. 2. Caractérisation biochimique des POs

Avant de pouvoir comprendre et interpréter le rôle potentiel des POs au sein du système immunitaire d'une espèce donnée et de pouvoir discuter les mécanismes mis en place tant au niveau physiologique que moléculaire, il est nécessaire de caractériser ces enzymes au niveau biochimique (Beckage, 2008).

4. 2. 1. Utilisation de substrats et d'inhibiteurs spécifiques

La première étape dans la caractérisation biochimique de l'activité PO d'une espèce consiste à déterminer quelle(s) sous-classe(s) est (sont) présente(s). Pour cela, il est possible de se baser sur la spécificité d'oxydation de chacune des 3 sous-classes : les monophénols ne pourront être oxydés que par des tyrosinases, les p-diphénols par les laccases, et si les o-diphénols sont oxydés tandis qu'aucun autre type de substrat ne l'est, il s'agit d'une catéchol oxydase. Cette première étape de caractérisation biochimique sera donc basée sur l'utilisation de différents substrats spécifiques d'une ou plusieurs sous-classes de POs. Chez les invertébrés, cette approche a permis de détecter les trois sous-classes de POs. Ainsi des tyrosinases ont été identifiées chez l'huître *Saccostrea glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007), le crabe *Charybdis japonica* (Fan *et al.*, 2009) ou encore le planaire *Dugesia japonica* (Pang *et al.*, 2010). Des catéchol oxydases ont été identifiées chez la pupa de mouche *Sarcophaga bullata* (Wang *et al.*, 2004) ou chez le puceron *Sitobion avenae* (Urbanska *et al.*, 1998) tandis que des laccases ont été identifiées chez le papillon *Manduca sexta* (Dittmer *et al.*, 2004), chez la cicadelle *Nephotettix cincticeps* (Hattori *et al.*, 2005) et récemment chez l'huître *Crassostrea gigas* (Luna-Acosta *et al.*, 2010). Dans la plupart des travaux publiés, les PO suivent les lois de

Michaelis Menten. Les constantes cinétiques sont calculées pour le substrat le plus communément utilisé, à savoir la L-DOPA: la constante de Michaelis correspond à la concentration en substrat pour laquelle la moitié des sites actifs sont occupés, cette valeur correspond à la stabilité du complexe enzyme substrat et est inversement proportionnelle à celle-ci. La valeur de V_{\max} , la vitesse maximale, correspond au turnover de l'enzyme, c'est-à-dire au nombre de molécules de substrat transformées en produit par unité de temps, à condition que l'enzyme soit saturée en substrat. En complément de l'utilisation de différents substrats, il est également possible d'utiliser différents inhibiteurs spécifiques d'une ou plusieurs sous-classes de POs. Le but est toujours de déterminer quelle sous-classe de POs est présente, mais aussi de comprendre le fonctionnement de l'enzyme et de son site actif notamment en étudiant le type d'inhibition exercé par chacun des inhibiteurs. L'utilisation de différents inhibiteurs permet également de comparer l'efficacité relative de ceux-ci sur l'activité PO, notamment en comparant les valeurs de maximum d'inhibition ou encore d' IC_{50} (concentration en inhibiteur entraînant 50% d'inhibition de l'activité enzymatique).

4. 2. 2. Conditions optimales d'activité

La caractérisation d'une activité enzymatique passe également par la détermination des conditions optimales d'activité notamment en termes de température et de pH. Chez différentes espèces d'invertébrés, ces valeurs ont été déterminées pour les POs et les résultats obtenus peuvent différer fortement d'une espèce à l'autre. Ainsi, le pH optimal de la laccase de cicadelle, *Nephotettix cincticeps*, est compris entre 4,75 et 5 (Hattori *et al.*, 2005) alors que celui de la catéchol oxidase du puceron *Sitobion avenae* est compris entre 8,2 et 9,4 (Urbanska *et al.*, 1998). Cependant, pour de nombreuses espèces d'insectes, le pH optimal de l'activité PO est proche de la neutralité (Zufelato *et al.*, 2004). Cette tendance se retrouve également en milieu marin puisque le pH optimal de l'activité PO est compris entre 6 et 8 pour de nombreuses espèces parmi lesquelles *Charybdis japonica* (Liu *et al.*, 2006), *Penaeus chinensis* (Fan & Wang, 2002), dont le pH optimal est égal à 6, *Dugesia japonica* (Pang *et al.*, 2010), *Penaeus setiferus* (Simpson *et al.*, 1987), *Botryllus schlosseri* (Frizzo *et al.*, 1999), dont le pH optimal est égal à 7,5 ou encore *Penaeus californiensis* (Gollas-Galvan *et al.*, 1999) dont l'activité PO possède un pH optimal égal à 8.

La température optimale de l'enzyme est également déterminée pour caractériser les PO et comme dans le cas du pH, la température optimale de l'enzyme varie de façon importante d'une espèce à l'autre. Ainsi l'optimum thermique pour l'activité PO est égal à 20°C pour *Apis mellifera* (Zufelato *et al.*, 2004), 30°C pour *Drosophila melanogaster* (Asada & Sezaki,

1999), *Biomphalaria glabrata* (Bai *et al.*, 1997) et *Charybdis japonica* (Liu *et al.*, 2006) et atteint 45°C pour plusieurs espèces telles que *Chlamys farreri* (Sun & Li, 1999), *Penaeus setiferus* (Simpson *et al.*, 1987) ou encore *Heliothis virescens* (Lockey & Ourth, 1992). Comme toute réaction biochimique, l'activité PO est réalisée par une enzyme protéique dont l'activité thermo-dépendante est en relation avec la stabilité thermique de l'enzyme (Nelson, 2010). Aussi est-il possible, pour caractériser l'enzyme, de déterminer sa température de dénaturation, à savoir la température au-delà de laquelle la structure tridimensionnelle de l'enzyme est dénaturée et donc, le site actif n'est plus opérationnel.

4. 2. 3. Purification des POs

Des expérimentations de purification ont été menées sur les formes inactives (proPO) et actives (PO) de l'enzyme, notamment à l'aide de techniques de chromatographie. Les colonnes de filtration sur gel utilisées sont des colonnes de type Sephadex G-75 (Zibae *et al.*, 2011), Sephacryl S-300 (Burks & Fuchs, 1995 ; Cherqui *et al.*, 1996), Sephacryl S-100 (Cong *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2006) ou encore Superose 6 HR (Jaenicke & Decker, 2003). Des colonnes de chromatographie échangeuse d'ions sont également utilisées, notamment des colonnes de type DEAE Sepharose (Burks & Fuchs, 1995 ; Fan *et al.*, 2009), Fractogel EMD DEAE (Jaenicke & Decker, 2003), Q-Sepharose (Cong *et al.*, 2005) ou encore DEAE Cellex-D (Frizzo *et al.*, 1999). En complément ou alternativement à ces techniques, des électrophorèses en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ont permis d'estimer le poids moléculaire des POs de différentes espèces: 62 KDa pour les POs de *Pacifastacus leniusculus* et *Halocynthia roretzi* (Aspán et Söderhall, 1991 ; Hata *et al.*, 1998), 81 KDa pour la proPO de *Locusta migratoria* (Cherqui *et al.*, 1996), 85 KDa pour la laccase de *Nephtettix cincticeps* (Hattori *et al.*, 2005) et 107 KDa pour *Penaeus californiensis* (Gollas-Galván *et al.*, 1999). Le poids moléculaire ainsi déterminé est fonction de l'état d'activation de l'enzyme mais peut aussi varier en fonction de différentes isoformes présentes (Liu *et al.*, 2006). Enfin, un autre paramètre a été déterminé dans certains cas afin de compléter la caractérisation biochimique de l'enzyme : il s'agit du point isoélectrique (pI), aussi appelé potentiel hydrogène isoélectrique (pHi). Ce paramètre est moins souvent déterminé que le poids moléculaire de l'enzyme mais il a été démontré que le pI de la proPO de *Locusta migratoria* est égal à 7,5 (Cherqui *et al.*, 1996), à 7,35 pour la PO de *Penaeus californiensis* (Gollas-Galván *et al.*, 1999) ou encore à 4,8 pour la PO de *Nephtettix cincticeps* (Hattori *et al.*, 2005).

La détermination de ces différents paramètres biochimiques permet de mieux comprendre le fonctionnement de l'enzyme, son activité et sa réactivité tant au plan physiologique que

moléculaire. Cependant, les valeurs de ces différentes constantes sont variables, pour une espèce donnée, en fonction des compartiments, des tissus ou des fluides étudiés, mais aussi en fonction des stades de vie des organismes étudiés. La détermination de ces paramètres en conditions « normales » permettra par la suite de comprendre d'éventuelles variations d'activité enzymatique en condition de stress afin d'élucider l'implication et le rôle des POs face à différentes sources de stress, qu'ils soient de nature biotique ou abiotique.

4. 3. Activité PO et stress biotiques

Un stress biotique peut se traduire par l'entrée d'un organisme étranger ou de molécules issues de celui-ci à l'intérieur d'un organisme hôte. Si le corps étranger parvient à pénétrer dans l'hôte il devra faire face au système immunitaire de l'hôte et notamment aux POs. Chez les insectes par exemple, le lépidoptère *Lacanobia oleracea* est parasité par *Eulophus pennicornis*. Ce parasitisme est associé à une baisse de l'activité PO dans l'hémolymph de la noctuelle et par conséquent, la mélanisation y est plus lente et plus faible que chez des individus non-parasités (Richards & Edwards, 2000). Cela signifie que le parasite prend le dessus sur le système immunitaire de son hôte grâce notamment à une inhibition du système PO. Cette inhibition n'est pas liée à une réduction du nombre d'hémocytes mais l'une des hypothèses émises est que les sécrétions du parasite pourraient contenir des inhibiteurs spécifiques des POs (Führer & Willers, 1986). De tels composés inhibiteurs de l'activité PO ont été identifiés, par exemple chez les bactéries du genre *Photorhabdus*, pathogène de *manduca sexta*. Ces bactéries sont capable de produire du (E)-1,3-dihydroxy-2-(isopropyle)-5-(2-pénylméthyl)benzène qui agit comme antibiotique pour écarter les microbes qui pourraient entrer en compétition sur le cadavre du lépidoptère mais aussi comme inhibiteur de PO de l'hôte dans le but de contrer son système immunitaire (Eleftherianos *et al.*, 2007). Dans ce sens, plusieurs études ont artificiellement inhibé l'activité PO, notamment en réprimant les gènes des proPOs. Ainsi, chez *Peneaus monodon*, deux gènes de proPOs ont été réprimés, ce qui a entraîné une baisse de l'activité PO de l'ordre de 75% avec pour conséquence une augmentation de la sensibilité de ces organismes face à la bactérie pathogène *Vibrio harveyi* par rapport à des organismes dont l'expression des gènes des proPOs n'était pas inhibée (Amparyup *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'écrevisse *Pacifastacus leniusculus* exposée à la bactérie *Aeromonas hydrophila* (Liu *et al.*, 2007) où il a été observé une baisse d'activité PO provoquée par la répression de gènes de proPOs. Celle-ci s'est accompagnée d'un plus faible taux de phagocytose, d'une meilleure croissance bactérienne et donc d'une plus grande sensibilité vis-à-vis de la bactérie pathogène. L'activité PO a

également été mise en avant dans l'interaction entre le micro-organisme pathogène *Marteilia sydneyi*, responsable de la maladie QX, et son hôte, l'huître *Saccostrea glomerata*. Ainsi, il a été montré, dans un premier temps, qu'il existe une corrélation négative entre le niveau d'activité PO chez les huîtres et le niveau d'infection par *M. sydneyi* (Peters & Raftos, 2003). Des programmes de sélection d'huîtres résistantes à la maladie ont été mis en place dans les élevages australiens et ont aboutit à la sélection d'individus présentant une activité PO significativement plus importante que des populations non-sélectionnées (Newton *et al.*, 2004). Dans le même temps, l'activité de différentes autres enzymes (esterase, N-acétylglucosaminidase, β -galactosidase, α -amylase, phosphatase alcaline et lysozyme) ont été comparées et ne présentaient pas de variations significatives. La poursuite de ce programme de sélection d'individus résistants a montré qu'une isoforme de PO en particulier a été contre-sélectionnée chez les individus résistants par rapport aux individus sauvages (Bezemer *et al.*, 2006). Le rôle de la PO au cours de la lutte contre la maladie QX a concrètement été démontré puisque lorsque le parasite a pénétré dans son hôte, les hémocytes phagocytent rapidement les sporonts du parasite et, sous l'action de la PO, le phagosome sera entièrement mélanisé (Figure 7) en 18 heures seulement (Butt & Raftos, 2008).

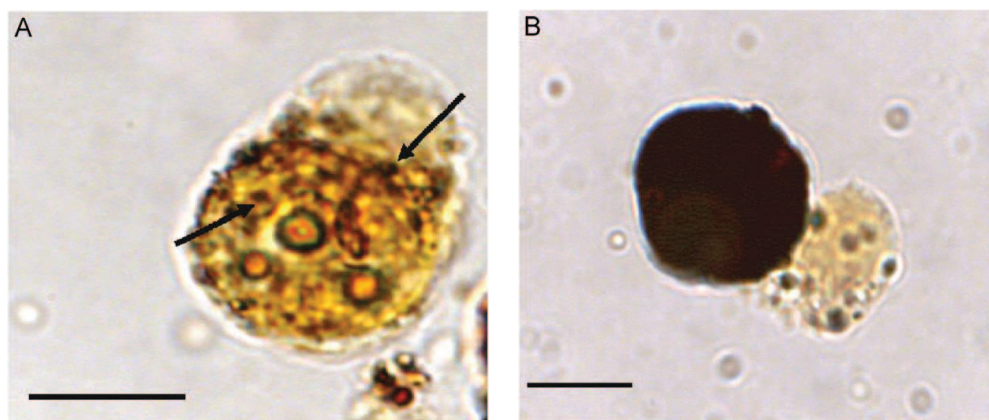


Figure 7. Formation de mélanine, sous l'action de la PO, après phagocytose de sporonts de *Marteilia sydneyi* par les hémocytes de *Saccostrea glomerata*. A : La mélanisation débute autour des sporonts phagocytés. B : Phagosome totalement mélanisé. Barre = 5 μ m. D'après Butt & Raftos, 2008.

En dehors du rôle incontestable de la PO dans la défense immunitaire, cette étude pointe du doigt le fait que contrairement aux arthropodes chez qui la PO n'est active que dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe (Söderhall *et al.*, 1994), chez *S. glomerata*, la PO peut être active dans les hémocytes. L'action antimicrobienne et bactéricide des POs a été étudiée

plus en détails et il a été démontré, chez *Chlamys farreri*, que les produits d'oxydation de la PO inhibent significativement la croissance de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* et d'*Aeromonas salmonicida* (Xing *et al.*, 2012). Des résultats allant dans le même sens ont été obtenus chez *Crassostrea gigas* dont les produits d'oxydation de la laccase inhibent la croissance de *Vibrio splendidus* LGP32 et *Vibrio aestuarianus* 02/041, deux bactéries pathogènes de l'huître (Luna-Acosta *et al.*, 2011).

Au sein des interactions entre un hôte et un organisme pathogène l'activité PO occupe un rôle important puisqu'une activité PO importante se traduira par une meilleure résistance face à l'invasion par des organismes pathogènes alors que dans le même temps, pour réussir à s'établir dans leur hôte et donc à survivre, les organismes pathogènes vont devoir affaiblir le système immunitaire de l'hôte et notamment le système PO.

4. 4. Activité PO et stress abiotiques

4. 4. 1. Température, pH, oxygène, salinité

Différentes études ont porté sur l'évolution des activités POs en fonction des variations des paramètres environnementaux abiotiques tels que la température, la salinité, le pH mais aussi en fonction de la présence de différents contaminants chimiques. L'influence du facteur thermique sur l'activité PO a précédemment été évoquée dans la partie « Caractérisation biochimique des phénoloxydases » à travers la recherche de la température optimale. Toutefois, la corrélation avec d'autres paramètres immunitaires n'a jusqu'alors pas été évoquée. Ainsi, il a été démontré que chez la langouste, *Panulirus interruptus*, l'activité PO et le nombre total d'hémocytes sont significativement plus faibles lorsque les animaux sont élevés dans une eau froide, à 4°C, par rapport à des animaux élevés à 14 ou 19°C (Gomez-Jimenez *et al.*, 2000). Des résultats comparables ont été obtenus chez *Macrobrachium rosenbergii* élevé à 20°C par rapport à des animaux élevés à 27 ou 30°C (Cheng & Chen, 2000). Cette baisse corrélée du niveau d'activité PO et du nombre total d'hémocytes, également observée chez *Farfantepenaeus californiensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1998) et chez *Carcinus maenas* (Hauton *et al.*, 1995), a lieu lorsque les animaux sont élevés dans des conditions thermiques optimales puis sont transférés à des températures plus élevées dans un temps relativement court (Cheng *et al.*, 2004c).

Dans un contexte de changement global, le premier paramètre environnemental étudié est la température mais l'augmentation globale des températures en milieu marin va de paire avec une acidification des eaux (Pörtner, 2008). Aussi, le pH est un autre facteur abiotique pouvant

impacter l'activité PO. Cette activité enzymatique augmente avec la valeur de pH lorsque celle-ci reste compris dans l'éventail « logique » des valeurs physiologiques de chaque espèce (Tanner *et al.*, 2006). Cet éventail physiologique est notamment défini par le pH de l'hémolymphe de l'espèce d'invertébré étudiée. Ainsi, le fait que le pH optimal pour la PO soit, de façon générale, plus faible chez les insectes que chez les arthropodes marins devrait correspondre à un pH plus faible de l'hémolymphe chez ces espèces (Cônsooli & Vinson, 2002).

Etant donné le fait que les phénomènes d'hypoxie sont généralement accompagnés d'une augmentation de la concentration en dioxyde de carbone et donc d'une acidification du milieu, il est difficile de considérer l'effet d'un facteur sans tenir compte du second. Cependant, la majorité des études explorent les effets de ces facteurs indépendamment. Tanner et collaborateurs (2006) ont montré que, pour de faibles concentrations en dioxygène dans l'hémolymphe (1%), l'activité PO était réduite de 70% chez le crabe *Callinectes sapidus*. Dans cette étude, le milieu réactionnel a été placé en milieu fermé et la concentration en dioxygène de ce milieu a été contrôlée afin de mimer l'hypoxie telle qu'elle est réellement dans l'hémolymphe des organismes. Les résultats obtenus sur *Callinectes sapidus* (Tanner *et al.*, 2006) mettent en avant une baisse de l'activité PO lorsque la concentration en dioxygène diminue et suggèrent donc que les épisodes d'hypoxie, voire d'anoxie, notamment en milieu littoral, amoindriraient considérablement les défenses immunitaires de ces invertébrés en les rendant davantage vulnérables aux organismes pathogènes. D'autres études portant sur l'effet de l'hypoxie peuvent être biaisées par le fait que ce sont les animaux entiers qui sont placés en milieu hypoxique et non pas l'enzyme en elle-même. Dans ces études, dès le moment du prélèvement d'hémolymphe et pendant la durée du dosage enzymatique l'enzyme n'est plus en condition hypoxique (Tanner *et al.*, 2006).

Pour les invertébrés marins, la salinité s'avère également être un facteur abiotique jouant un rôle sur les niveaux d'activité PO. En effet, chez l'huître *S. glomerata*, il a été démontré, d'abord en laboratoire, puis en milieu naturel le long d'une rivière, que le niveau d'activité PO est corrélé positivement à la salinité dans la limite des valeurs du milieu naturel (Butt *et al.*, 2006). Les années où les pluies sont importantes, la salinité des estuaires se trouve abaissée et le système immunitaire des huîtres est par conséquent affaibli. Cela se traduit par des épisodes de maladie QX plus importants et des mortalités élevées. Ces résultats obtenus sur l'impact de la salinité sur le niveau d'activité PO sont comparable à ceux obtenus pour

d'autres espèces telles que *Farfantepenaeus paulensis* (Perazzolo *et al.*, 2002), *Penaeus californiensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1998) ou encore *Haliotis diversicolor supertexta* (Chen & Chen, 2000).

4. 4. 2. Contaminants chimiques

Parmi les stress de nature abiotique susceptibles d'impacter les niveaux d'activité PO des organismes, différents contaminants chimiques ont été testés chez les invertébrés. Les tributylétains (TBT), dont l'utilisation est aujourd'hui interdite, restent présents dans de nombreuses zones du globe dans les sédiments. Leurs effets sur des hémocytes isolés du tunicier *Styela plicata* montrent une inhibition de l'activité PO pour des concentrations supérieures à 0,1 µg.L⁻¹ alors que, dans le même temps, une exposition au cuivre, au zinc, au cadmium, au plomb ou encore au mercure, aux mêmes concentrations, ne modifie pas le niveau d'activité PO par rapport à des hémocytes non-exposés (Tujula *et al.*, 2001). Des individus entiers ont également été soumis à une même exposition aux TBT et l'ensemble des hémocytes a été collecté : sur ces échantillons, l'activité PO est significativement plus importante que pour les animaux non-exposés. Cette différence de tendance entre l'exposition cellulaire et l'exposition de l'animal entier s'explique par un recrutement important des hémocytes dans l'hémolymphe. Ainsi, l'inhibition d'activité PO observée au niveau cellulaire est contrebalancée par une augmentation des cellules à l'origine de cette activité enzymatique. L'activité PO, au niveau de l'organisme se voit donc augmentée après une exposition aux TBT (Tujula *et al.*, 2001). L'inhibition de l'activité PO, constatée au niveau cellulaire, s'oppose aux résultats obtenus par Mottin et collaborateurs (2010) chez l'ormeau *Haliotis tuberculata* après une exposition au zinc. En effet, les hémocytes de cette espèce possèdent une activité PO plus importante après une exposition au zinc par rapport à des hémocytes non-exposés. Un autre exemple d'augmentation d'activité des hémocytes est celui de *Crassostrea gigas* après une exposition à l'hydrocarbure benzo[b]fluoranthène (Bado-Nilles *et al.*, 2008). L'exposition à d'autres composés toxiques tels que les polychlorobiphényles (PCB) a été étudiée et a résulté, chez la crevette *Crangon crangon*, en une baisse d'activité PO dans les hémocytes (Smith & Johnston, 1992). Ainsi, il n'y a pas de réponse type de l'activité PO face aux contaminants chimiques puisque l'activité PO semble varier en fonction des espèces, du type, et de la forme des contaminants étudiés (Mottin *et al.*, 2010).

4. 5. Effets couplés de stress biotiques et abiotiques

Dans leur milieu naturel, les espèces animales ne sont que rarement exposées à un seul stress et peuvent subir la pression conjuguée de stress d'origine biotique et abiotique. Aussi plusieurs études se sont intéressées à l'impact des variations des paramètres environnementaux sur la relative susceptibilité ou résistance d'organismes face à un organisme pathogène, notamment à travers la modulation de l'activité PO. Chez l'ormeau, *Haliotis tuberculata*, la ponte et la gamétogénèse qui la précède peuvent être considérées comme un stress biotique endogène puisque celui-ci provoque une dépression immunitaire qui se traduit par une baisse de l'activité PO et de la phagocytose et une augmentation de la production des EROs (Travers *et al.*, 2008). Cette dépression immunitaire, lorsqu'elle est conjuguée à des températures de l'eau élevées et à la présence de la bactérie pathogène *Vibrio harveyi*, augmente considérablement la susceptibilité de l'ormeau à cette bactérie et, par conséquent, le taux de mortalité par vibriose (Travers *et al.*, 2009). Chez une autre espèce d'ormeau, *H. diversicolor supertexta*, il a été démontré qu'un stress ammoniacal entraîne une baisse de l'activité PO au cours du temps, ce qui traduit une augmentation de la susceptibilité face à *Vibrio parahaemolyticus* et par conséquent une augmentation des mortalités par vibriose (Cheng *et al.*, 2004b). Chez cette même espèce d'ormeau, les capacités immunitaires, notamment l'activité PO, et la susceptibilité face à *V. parahaemolyticus* ont été étudiées en présence de fluctuations d'autres paramètres environnementaux tels que la température de l'eau (Cheng *et al.*, 2004c), la salinité (Cheng *et al.*, 2004d), la concentration en oxygène dissous (Cheng *et al.*, 2004e) ou encore en nitrite (Cheng *et al.*, 2004a). Tout comme chez l'ormeau, chez les crevettes *Macrobrachium rosenbergii* et *Litopenaeus vannamei*, l'application d'un stress ammoniacal entraîne une baisse de l'activité PO, une augmentation de la sensibilité à leurs micro-organismes pathogènes respectifs, à savoir *Enterococcus* et *Vibrio alginolyticus*, et par conséquent, une augmentation des mortalités (Cheng & Chen, 2002 ; Liu & Chen, 2004).

Bien que le fonctionnement et les différents rôles des POs au sein du système immunitaire des invertébrés aient été étudiés chez différentes espèces, les études portant sur les invertébrés marins restent minoritaires par rapport aux nombreuses études menées sur les insectes. Au sein des organismes marins, les travaux sur les arthropodes sont les plus développés et l'étude des POs chez les mollusques et particulièrement chez les bivalves, reste à ce jour minoritaire.

5. Modèle biologique : la palourde japonaise *Venerupis philippinarum*

A ce jour, le système enzymatique des phénoloxydases a déjà été caractérisé chez une espèce de mollusque bivalve : l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Sa potentielle utilisation comme biomarqueur de stress environnementaux et plus particulièrement d'expositions à différents contaminants organiques a fait l'objet d'un travail de thèse (Luna-Acosta, 2010). Cependant il reste difficile d'extrapoler les résultats obtenus à la palourde japonaise, tant l'écologie et le métabolisme de ces organismes présentent des différences. En effet, alors que l'huître est un organisme sessile ne pouvant fuir les sources de stress autrement qu'en fermant ses valves, la palourde est capable de se déplacer et de s'enfouir grâce à son squelette hydrostatique. Ainsi, la palourde, qui fait partie de l'endofaune, et l'huître, qui fait partie de l'épifaune, n'ont pas à faire face aux mêmes fluctuations de facteurs tels que l'hydrodynamisme, la dessiccation ou encore la disponibilité en oxygène ou en nourriture (Le Grand *et al.*, 2011). Différentes études, basées sur l'utilisation de la cytométrie en flux ont également permis de mettre en avant des différences morphologiques, structurales et fonctionnelles entre les hémocytes des 2 espèces (Cima *et al.*, 2000 ; Lambert *et al.*, 2003, 2007 ; Labreuche *et al.*, 2006 ; Donaghy *et al.*, 2009 ; Le Grand *et al.*, 2011). La réponse immunitaire à l'exposition à un même organisme pathogène peut également différer, entre ces 2 espèces de bivalves, comme cela a été démontré à travers la production d'EROs chez des individus exposés à des produits bactériens (Labreuche *et al.*, 2006 ; Donaghy *et al.*, 2009).

Par ailleurs, un des intérêts majeurs de l'étude du système PO chez la palourde japonaise réside dans l'implication de cette espèce dans une interaction complexe avec une bactérie pathogène responsable de la Maladie de l'Anneau Brun (MAB). Dans ce contexte de MAB, chez *Venerupis philippinarum*, l'implication de la cascade PO semble majeure étant donné les dépôts mélanisés visibles sur les valves d'animaux malades.

5. 1. Classifications, origine et répartition de l'espèce

5. 1. 1. Classifications phylogénétique et taxonomique

Selon la classification phylogénétique du vivant (Lecointre *et al.*, 2001), la palourde japonaise, *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeves, 1850), appartient aux taxons suivants : eucaryotes, nicontes, opisthocontes, métazoaires, eumétazoaires, bilatériens, protostomiens, lophotrochozoaires, eutrochozoaires, spiraliens, mollusques, eumollusques, conchifères, ganglioneux, diasomes, bivalves.

La classification taxonomique de la palourde japonaise, *Venerupis philippinarum*, est détaillée dans le tableau 1.

Tableau 1. Classification taxonomique de la palourde japonaise *Venerupis philippinarum*.

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Mollusca</i>
Classe	<i>Bivalvia</i> (Linné, 1758)
Ordre	<i>Veneroidea</i> (Adams & Adams, 1957)
Famille	<i>Veneridae</i> (Rafinseque, 1815)
Genre et espèce	<i>Venerupis philippinarum</i>

De nombreux synonymes ont pu être ou sont toujours utilisés pour la palourde japonaise. Ces synonymes sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Synonymies des noms de genre et d'espèce de la palourde japonaise, *Venerupis philippinarum* (d'après Parache, 1982 ; Laruelle 1999).

GENRE	ESPECE
<i>Venerupis</i>	<i>philippinarum</i>
	<i>semidecussatus</i>
	<i>japonica</i>
<i>Ruditapes</i>	<i>philippinarum</i>
	<i>semidecussatus</i>
<i>Tapes</i>	<i>philippinarum</i>
	<i>semidecussatus</i>
	<i>denticulata</i>
	<i>indica</i>
	<i>grata</i>
	<i>quadriradiata</i>
	<i>violenscens</i>
	<i>japonica</i>
	<i>bifurcata</i>
<i>Venus</i>	<i>semidecussatus</i>
	<i>japonica</i>
	<i>tesselata</i>
	<i>semidecussata</i>
<i>Amygdala</i>	<i>philippinarum</i>
	<i>semidecussata</i>
	<i>japonica</i>
	<i>ducalis</i>
<i>Paphia</i>	<i>philippinarum</i>
	<i>bifurcata</i>
<i>Protothaca</i>	<i>bifurcata</i>

5. 1. 2. Origine et répartition de l'espèce

La palourde japonaise, *Venerupis philippinarum*, est originaire de la zone Indo-pacifique où son aire de répartition d'origine s'étendait du Pakistan (30°N, 65°E) jusqu'aux îles Kouriles situées au nord de l'océan pacifique (50°N, 150°E). La figure 8 présente les aires de répartition d'origine (rouge) et actuelle (verte) de *V. philippinarum* au niveau mondial. La différence entre ces aires s'explique par une série d'introductions de l'espèce, volontaires ou accidentelles, dans différentes zones du globe.

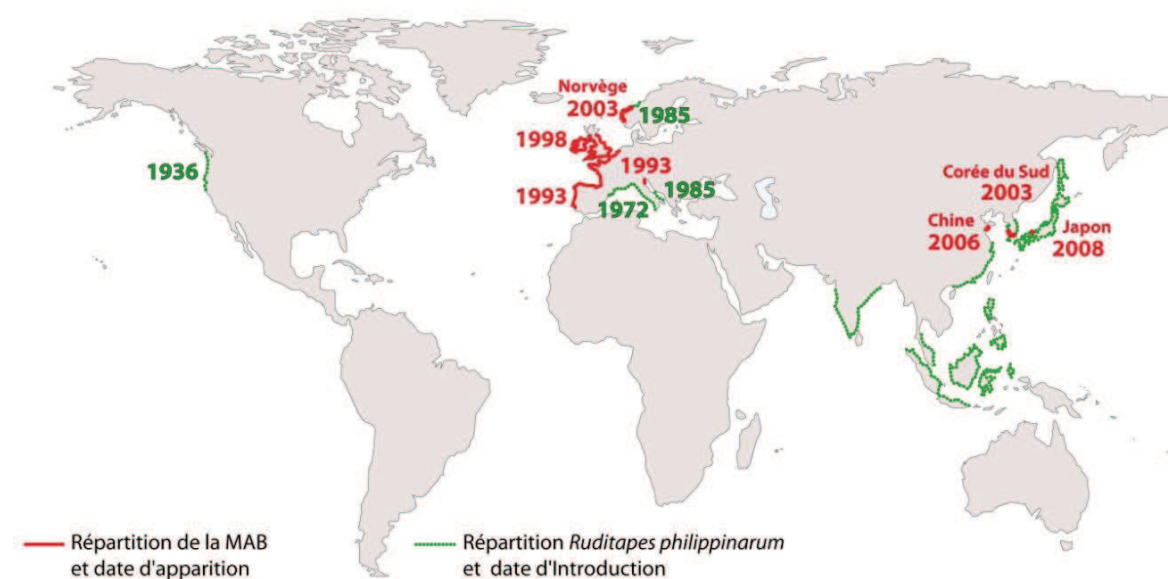


Figure 8 : Aire de répartition de *Venerupis philippinarum*, à l'échelle mondiale. Les dates correspondent aux dates d'introductions de l'espèce (vert) et d'apparition de la MAB (rouge) dans les différentes zones du globe. Modifié d'après Paillard 2004.

La palourde japonaise a, dans un premier temps, été introduite à des fins aquacoles à Hawaï en 1920 (Yap, 1977). En 1936, l'espèce a été introduite accidentellement, avec du naissain d'huîtres japonaises, le long des côtes de l'Oregon (Quayle, 1964) où l'espèce s'est établie avant d'élargir son aire de répartition de la Californie, au sud, jusqu'à la Colombie Britannique au nord de la côte Pacifique des Etats-Unis (Bourne, 1982). Sur le continent européen, la palourde japonaise a été introduite, depuis les Etats-Unis, en France en 1972, puis en Grande Bretagne en 1980, en Italie et en Espagne 5 ans plus tard, en Norvège en 1987 et en Irlande en 1997 (Breber, 1985 ; Flassch & Leborgne, 1992 ; Paillard, 2004a). Ces introductions étaient motivées par des raisons aquacoles étant donné la croissance plus rapide et le taux de recrutement plus important de l'espèce par rapport à l'espèce européenne

Venerupis decussata (Linnaeus, 1758). Suite à ces introductions, l'espèce s'est relativement bien adaptée et s'est naturellement établie dans de nombreuses zones où elle fut introduite et où les conditions thermiques étaient favorable à sa reproduction sachant que la gamétogénèse de cette espèce peut avoir lieu à partir de 12°C (Cesari & Pellizzato, 1990 ; Laruelle, 1999 ; Park & Choi, 2004 ; Humphreys *et al.*, 2007).

5. 2. Biologie, anatomie et écologie de *Venerupis philippinarum*

5. 2. 1. Biologie de *Venerupis philippinarum*

L'aire de répartition mondiale de l'espèce témoigne de sa tolérance importante vis-à-vis des paramètres environnementaux notamment en termes de salinité et de température. En effet, l'espèce possède une température optimale de croissance entre 20 et 24°C mais peut vivre dans des eaux dont la température varie entre 10 et 30°C (Solidoro *et al.*, 2000). Cependant, l'espèce peut survivre, sur de relatives courtes périodes de temps, dans des eaux à 0°C jusqu'à 30°C (FAO). La palourde japonaise peut vivre dans des eaux dont la salinité est comprise entre 12 et 32‰ mais peut temporairement supporter des salinités plus faibles ou plus élevées en fonctions des marées (Flye Sainte Marie, 2007). Ce mollusque bivalve est un animal benthique, fouisseur, suspensivore que l'on retrouve du haut de l'estran jusqu'aux premiers mètres de la zone subtidale des baies et estuaires (Flye Sainte Marie, 2007). Les individus de cette espèce sont présents dans différents types de sédiments des sables grossiers aux herbiers de *Zostera noltii* en passant par les sédiments vaseux, dans lesquels ils vont s'enfouir jusqu'à plusieurs centimètres de profondeur (Flye Sainte Marie, 2007) pour ne laisser dépasser que l'extrémité des siphons qui vont capter la nourriture, à savoir du microphytobenthos, du phytoplancton mais aussi des matières organiques détritiques. Le long des côtes françaises, la taille moyenne de cette espèce, à l'âge adulte, est de 70 millimètres mais elle peut atteindre jusqu'à 100mm et ne doit pas être inférieure à 35mm pour pouvoir être pêchée (Quéro & Vayne, 1998).

5. 2. 2. Anatomie de l'espèce

La palourde en tant que mollusque bivalve possède un corps mou, comprimé latéralement et protégé par une coquille formée de deux valves symétriques réunies par un ligament, non-calcifié, situé en position dorsale de l'animal (Figure 9). L'articulation des deux valves se fait grâce à la charnière formée par le ligament élastique, les dents et les encoches complémentaires. Lors de la contraction des muscles adducteurs, les valves se ferment et compriment le ligament. A l'inverse, le relâchement des muscles adducteurs (antérieur et postérieur) provoque l'ouverture des valves sous la poussée du ligament. Le corps mou de

l'animal est délimité par le manteau qui isole lui-même la cavité palléale des cavités extrapalléales (Figure 9). Les lobes du manteau, aussi appelés pallium, naissent au niveau de la ligne médio-dorsale et retombent de part et d'autre des flancs délimitant ainsi en leur sein la cavité palléale. C'est également le manteau qui est impliqué dans la formation de la coquille calcifiée de l'animal.

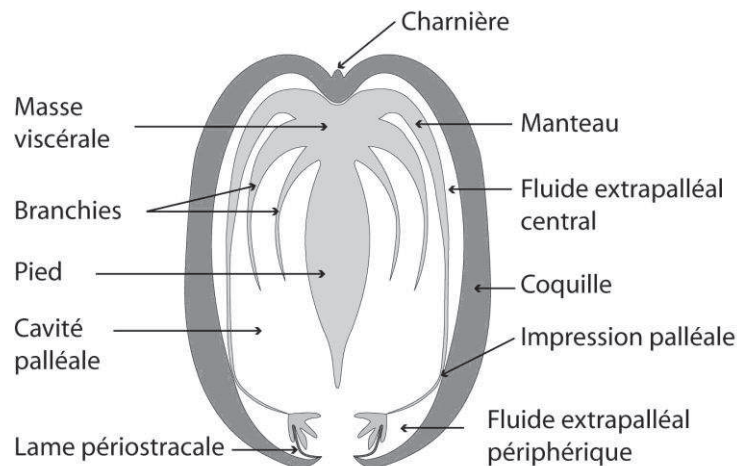


Figure 9. Représentation schématique d'une palourde japonaise, *Venerupis philippinarum*, en coupe transversale (Modifié d'après Paillard, 2004b).

L'enfouissement de l'animal est assuré par le squelette hydrostatique du pied musculueux qui va permettre à l'animal de s'ancrer dans le sédiment puis, par contraction, de s'enfoncer dans celui-ci. Les deux siphons, l'un inhalant en position ventrale, l'autre exhalant en position dorsale, sont soudés l'un à l'autre ce qui différencie l'espèce Japonaise de la palourde Européenne dont les siphons sont nettement séparés (Quéro & Vayne, 1998 ; Flye Sainte Marie, 2007). Le siphon inhalant conduit l'eau de mer jusqu'aux 4 feuillets branchiaux (ou cténidies) qui jouent un rôle respiratoire mais également alimentaire puisqu'ils vont retenir les particules alimentaires, les conduire jusqu'aux palpes labiaux à l'extrémité antérieure des branchies. Les particules alimentaires sont alors dirigées vers l'ouverture de la bouche puis sont conduits à travers l'œsophage puis l'estomac où l'on trouve un stylet cristallin qui va participer à la dégradation des particules alimentaires par voies mécanique et enzymatique. Le système digestif se termine par le rectum puis par l'anus qui est situé juste au dessus du siphon exhalant, en position dorsale. Le système nerveux est, quant à lui, composé de 3 paires de ganglions : une paire de ganglions cérébroïdes, une paire de ganglions pédieux et une paire de ganglions viscéraux. Comme l'ensemble des mollusques, la palourde japonaise possède un système circulatoire semi-ouvert contenant l'hémolymphe, laquelle est animée par l'action d'un cœur constitué d'un ventricule et de deux oreillettes et délimité par la cavité

péricardique. Le système excréteur quant à lui, est composé d'une paire de reins (ou métanéphridies), débouchant dans la cavité péricardique via le néphridiopore.

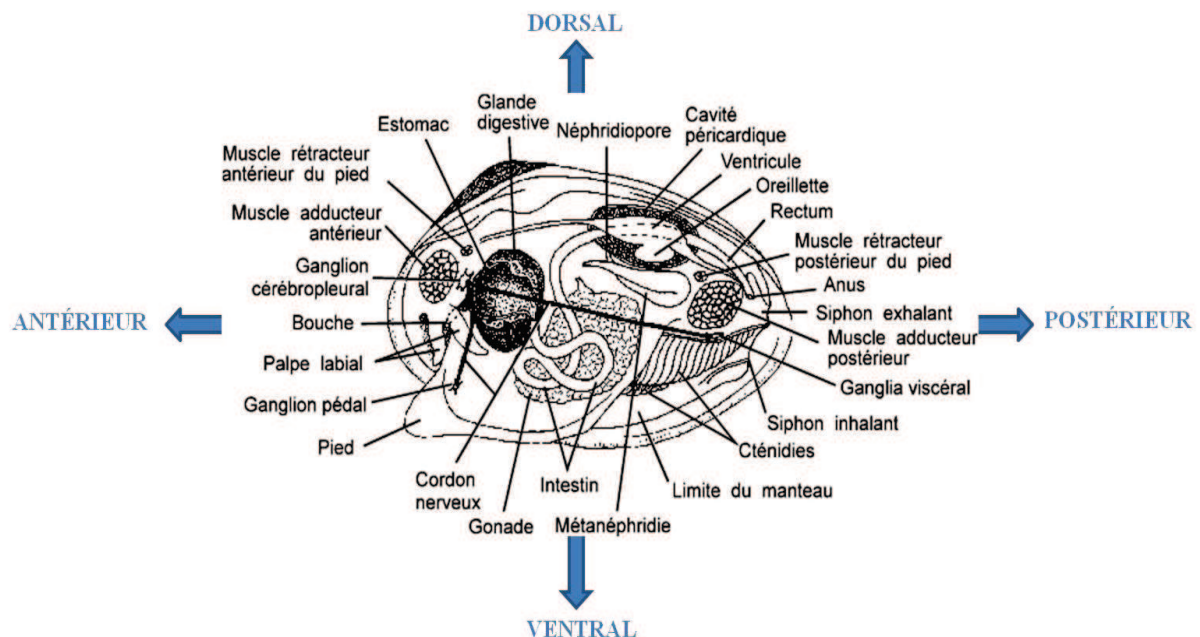


Figure 10. Anatomie interne et orientation d'une palourde japonaise, *Venerupis philippinarum*, dont la valve gauche et le manteau gauche ont été ôtés (Travaux pratiques, Licence, UBO).

5. 2. 3. Reproduction et cycle de vie

Venerupis philippinarum est une espèce gonochorique, à fécondation externe, dont les gonades forment une masse relativement diffuse, au sein de la masse viscérale, traversée par l'intestin (Figure 10) (Goulletquer, 2005). Les palourdes japonaises sont matures à l'âge de 2 ans pour une taille de 20mm en eaux tempérées. La gamétogénèse est déclenchée par une température de l'eau entre 8 et 12°C (Laruelle, 1999 ; Park & Choi, 2004) et dure entre 2 et 5 mois selon les conditions environnementales (Devauchelle, 1990 ; Laruelle, 1999 ; Park & Choi, 2004 ; Goulletquer, 2005). La présence de nourriture dans le milieu est également une condition nécessaire à la gamétogénèse et influence la quantité de gamètes produites (Goulletquer, 2005). Le long des côtes atlantiques françaises, une ponte principale survient entre fin août et début septembre (Goulletquer, 1989 ; Robert *et al.*, 1993 ; Laruelle, 1999) et selon les conditions environnementales, elle s'accompagne de pontes partielles, et moins efficaces en terme de recrutement, entre fin mai et fin août (Laruelle, 1999 ; Calvez, 2003). Des pontes tardives peuvent également être observées à la fin de l'automne si les conditions environnementales le permettent (Goulletquer, 1989). *V. philippinarum* est une espèce à cycle

méroplanctonique, les gamètes sont émises dans la masse d'eau où a lieu la fécondation et le développement larvaire. Les œufs fécondés, d'une taille moyenne de 70µm (Pronnier, 1996) atteignent le stade de larve D, ou de larve trocophore ciliée 24 à 48 heures après la fécondation, ces larves mesurent alors 100µm (Helm, 1990 ; Jones *et al.*, 1993 ; Calvez, 2003). Au cours de cette vie larvaire planctonique, dont la durée peut varier entre 10 et 15 jours en moyenne, les organismes vont se déplacer dans la masse d'eau grâce au développement de leur vélum (Quéro & Vayne, 1998 ; Jones *et al.*, 1993 ; Calvez, 2003). Les larves se nourrissent alors de phytoplancton et vont subir une dispersion passive du fait des courants (Calvez, 2003). La fin de cette vie larvaire est associée à la transformation des larves D en larves pédivéligères, c'est-à-dire dotées d'un pied. Cette métamorphose est caractérisée par la disparition du vélum, l'apparition de la glande digestive, des organes reproducteurs et le début de formation de la coquille alors caractérisée par un aspect granulaire (Le Pennec, 1978 ; Mao Che *et al.*, 2001). Ainsi du tissu gonadique est observable chez des animaux ayant une taille supérieure à 15mm (Flye Sainte Marie, 2007). Cette métamorphose va également marquer la fin de la vie planctonique de l'espèce et le commencement de sa vie benthique puisque les juvéniles vont alors sédimenter sur le fond et se fixer grâce au byssus synthétisé par la glande byssogène situé dans le pied (Jones *et al.*, 1993 ; Marin *et al.*, 2008). Cette sédimentation est accompagnée d'une sélection active du substrat puisque les juvéniles vont préférentiellement se fixer sur des substrats sableux par rapport aux substrats vaseux (Calvez, 2003).

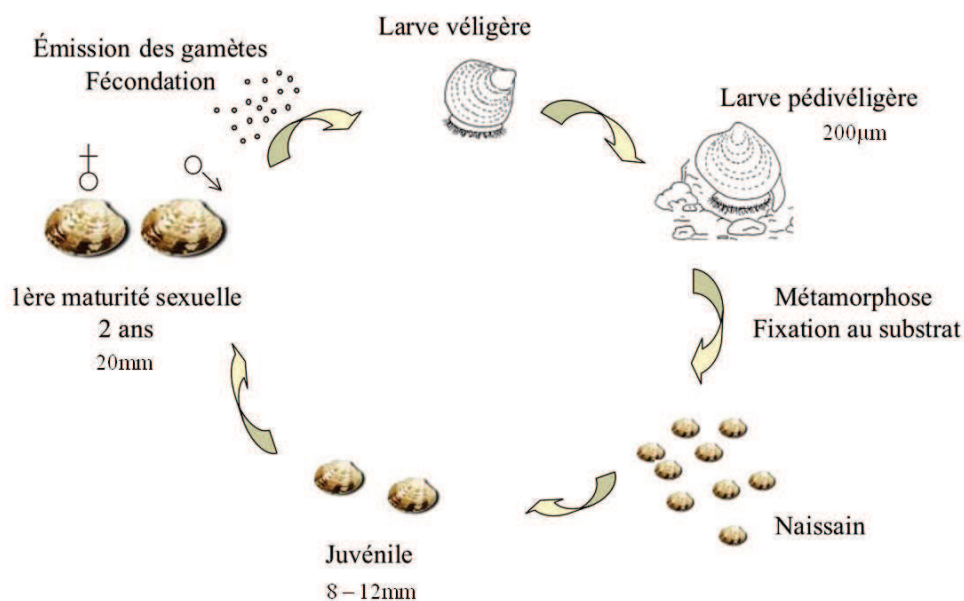


Figure 11. Cycle de vie de la palourde japonaise, *Venerupis philippinarum* (Travaux pratiques, Licence, UBO).

5. 3. La maladie de l'anneau brun

Au niveau mondial, la palourde japonaise est aujourd'hui la deuxième espèce la plus produite en termes de tonnage, juste derrière l'huître *Crassostrea gigas* et juste devant la moule *Mytilus edulis* (Goulletquer, 2005). Ainsi en 2011, la production mondiale de *V. philippinarum* représentait 3 681 436 tonnes contre 4 318 940 tonnes pour *C. gigas*. La grande majorité de la production mondiale de palourdes japonaises est concentrée dans un seul pays : la Chine qui a produit, en 2011, 3 613 349 tonnes ce qui représente plus de 3 milliards de dollars. En France, qui fait partie des 10 plus gros producteurs de palourdes japonaises, la production a atteint, en 2011 580 tonnes ce qui représente un marché de 6,4 millions de dollars (FAO fisheries statistics - www.fao.org/fishery/statistics). Cependant, depuis près de 30 ans les élevages vénéricoles français et d'autres pays depuis, ont dû compter avec un nouveau facteur influençant fortement la production : la maladie de l'anneau brun (MAB).

5. 3. 1. Historique de la maladie de l'anneau brun

Introduite en France en 1972, *V. philippinarum* s'est répandue dans les élevages aquacoles mais aussi dans le milieu naturel le long de la façade atlantique française, notamment dans le bassin d'Arcachon, à Marennes-Oléron ainsi que dans les Abers dans le Nord Finistère (Goulletquer, 1989a ; Robert & Deltreil, 1990 ; Flassch & Leborgne, 1992). C'est dans cette dernière zone des Abers et plus précisément à Landéda, alors premier site vénéricole de France, qu'ont eu lieu de fortes mortalités de palourdes japonaises juvéniles et adultes entre le printemps et l'été 1987 (Paillard & Maes, 1990 ; Flassch *et al.*, 1992). Les palourdes mortes, remontantes à la surface, présentaient un syndrome caractéristique à savoir un dépôt brun à la périphérie de la surface interne des valves (Figure 12) (Paillard & al, 1989). Ce symptôme caractéristique est à l'origine du nom de Maladie de l'Anneau Brun (MAB).



Figure 12. Valve droite de palourde japonaise présentant le symptôme caractéristique de la maladie de l'anneau brun.

La maladie de l'anneau brun, associée à de fortes mortalités s'est ensuite rapidement propagée le long des côtes françaises : à Marennes Oléron en 1988 (Gouttelquer, 1989) et un an plus tard dans le bassin d'Arcachon (Robert et Dultreil, 1990). Par la suite, la maladie a été détectée le long des côtes italiennes en 1990, espagnoles en 1993, britanniques en 1997, irlandaises en 1998, tunisiennes en 2000 et norvégiennes en 2003 (Paillard, 2004a). La MAB a également été détectée sur le continent asiatique puisque des palourdes malades ont été retrouvées en Corée du sud en 2003 et au Japon en 2004 (Park *et al.*, 2008). Le continent américain semble, à ce jour, épargné par la maladie.

5. 3. 2. L'agent pathogène : *Vibrio tapetis*

L'agent pathogène, responsable de la maladie de l'anneau brun, a été isolé pour la première fois à Landéda et a été nommé dans un premier temps *Vibrio* Prédominant 1 (VP1) puis *Vibrio tapetis* (Paillard *et al.*, 1994 ; Borrego *et al.*, 1996). Tout comme l'ensemble des vibrions, *V. tapetis* est un bacille Gram négatif, mésophile, chimio-organotrophe et anaérobie facultatif qui possède deux chromosomes circulaires (Heidelberg *et al.*, 2000 ; Makino *et al.*, 2003). La classification taxonomique de cette bactérie est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Classification taxonomique de *Vibrio tapetis*.

Règne	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i> (Stackebrandt <i>et al.</i> , 1988)
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Vibrionales</i>
Famille	<i>Vibrionaceae</i> (Véron, 1965)
Genre et espèce	<i>Vibrio tapetis</i>

Les 4 postulats de Koch ont été vérifiés une fois l'espèce isolée à savoir : description des symptômes chez des individus malades chez lesquels le micro-organisme est présent ; isolement du micro-organisme et culture *in vitro* ; démonstration que le micro-organisme isolé d'individus malade entraîne la maladie chez des individus sains ; isolement du micro-organisme à partir d'individus rendus malades expérimentalement et identification comme étant identique au micro-organisme d'origine (Paillard & Maes, 1990).

Depuis l'apparition de la maladie en 1987, de nombreuses souches de *V. tapetis* ont été isolées à travers le monde et sur différentes espèces de mollusques mais aussi de poissons (Paillard & Maes, 1992 ; Castro *et al.*, 1992 ; Reid *et al.*, 2003 ; Jensen *et al.*, 2003 ; Paillard 2004a ; López *et al.*, 2011 ; Matsuyama *et al.*, 2010) mais la souche CECT 4600 isolée lors des

premiers épisodes de mortalité à Landéda reste à ce jour la souche la plus virulente pour *V. philippinarum* (Choquet *et al.*, 2003). Cette espèce possède une fenêtre thermique de croissance assez large puisque ce *Vibrio* peut croître à partir de 4°C (Borrego *et al.*, 1996) mais sa température optimale est de 18°C . Au-delà de 27°C, la bactérie ne survit pas (Maes, 1992 ; Haberkorn, 2005).

5. 3. 3. Développement de la maladie

Pour infecter *V. philippinarum*, *V. tapetis* pénètre dans la cavité palléale de l'animal ou par les siphons puis se fixe, via ses pili, à la lame périostracale (Figure 13).

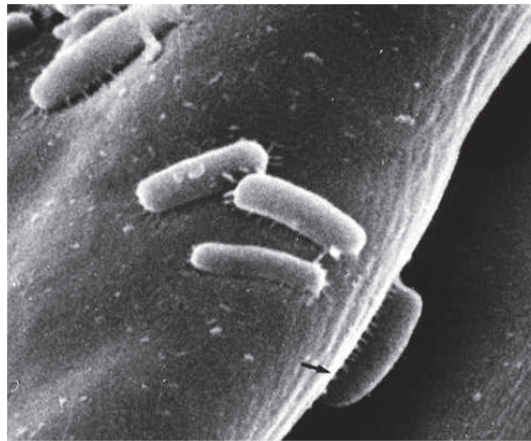


Figure 13. Adhérence de *V. tapetis*, via ses pili, à la lame périostracale de *V. philippinarum*. Observation au microscope à balayage électronique (X 13000). D'après Paillard & Maes, 1995a.

La bactérie colonise alors la périphérie de la couche interne des valves, le bord du manteau et le périostracum qu'il va dégrader (Paillard, 1992 ; Paillard & Le Pennec, 1993 ; Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard & Maes, 1995a, b). Cette dégradation du périostracum va entraîner, chez la palourde infectée, une production de matrice organique coquillière de couleur brune appelée conchioline (Figure 14).

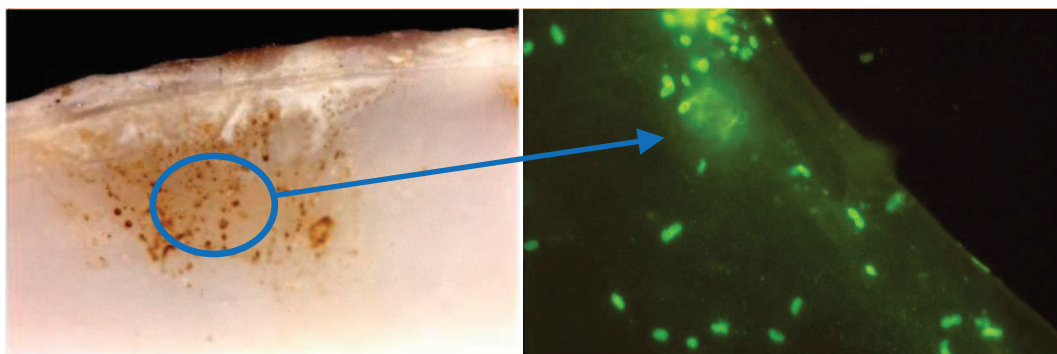


Figure 14. Site de colonisation par *V. tapetis* de la lame périostracale de *V. philippinarum*. D'après Paillard, 2004b (gauche) et Allam *et al.*, 1996 (droite).

Cette matrice, recouvrant la zone infectée, est insoluble (Grégoire *et al.*, 1954), mélanisée (Paillard, 1992) et possède une composition biochimique différente de celle de la matrice coquillière (Goulletquer *et al.*, 1989 ; Trinkler *et al.*, 2011). Ce dépôt brun, microscopique au début du développement de la maladie, va progressivement s'étaler sur la face interne des valves, s'épaissir et être le siège de colonisations bactériennes (Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard & Maes, 1995b). L'anneau brun (Figure 15), à l'origine du nom de la maladie, est donc le résultat de la dégradation de la lame périostracale et du recouvrement par une couche mélanisée de conchioline.



Figure 15. Coquille de palourde japonaise présentant, sur chacune de ses valves, l'anneau brun de conchioline, symptomatique de la Maladie de l'Anneau Brun (MAB).

Au cours de la phase de recouvrement du *Vibrio* par les couches de conchioline, les POs sont directement impliquées et jouent un rôle pour circonscrire l'invasion par la bactérie pathogène (Paillard, 1992 ; Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard, 2004a).

Le développement de la maladie se traduit ensuite par une colonisation des fluides extra-palléaux centraux ce qui peut entraîner, chez des animaux à des stades très avancés de maladie, la formation d'un dépôt brun sur une grande partie de la face interne des valves.

Vibrio tapetis peut également devenir, chez des hôtes gravement atteints, un parasite interne en profitant de lésions dans les tissus, notamment au niveau du manteau, pour pénétrer dans le système circulatoire et atteindre ainsi tous les tissus. Dans ce cas de figure, il s'en suit une septicémie entraînant la mort rapide de l'hôte (Allam *et al.*, 2002 ; Paillard, 2004b). Le recouvrement des zones infectées par une matrice coquillière de conchioline est une première réponse à l'invasion bactérienne mais l'hôte est également capable de recouvrir le dépôt organique par des couches calcaires, c'est-à-dire de reconstruire une coquille par-dessus la zone d'infection (Paillard *et al.*, 1994). Ainsi, pour quantifier l'avancement de la maladie, il est possible d'évaluer d'une part, l'importance des dépôts de conchioline, et d'autre part, la réparation coquillière (Trinkler *et al.*, 2010, 2011).

5. 3. 4. La classification de la maladie de l'anneau brun

5. 3. 4. 1. Les stades de développement de la maladie de l'anneau brun

Cette classification se fait à partir de l'observation de la face interne des valves de l'animal après la mort de celui-ci. Paillard et Maes (1994) ont établi une classification des stades de maladie qui tient compte des différentes zones de chacune des valves sur lesquels sont présents des dépôts de conchioline et de l'importance et l'épaisseur de ces dépôts. Pour ce faire, les valves sont divisées en 6 zones : la zone sub-articulaire, la zone centrale, la zone sinusale et les zones périphériques antérieure, ventrale et postérieure (Figure 16).

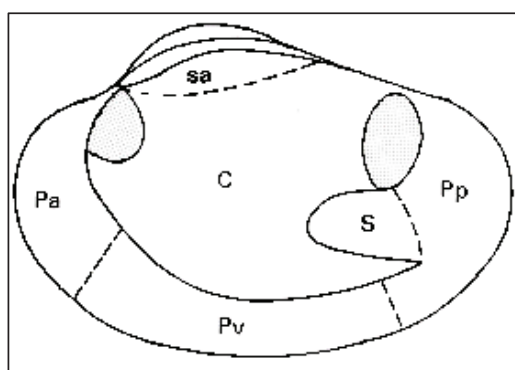


Figure 16. Découpage de la face interne d'une valve de palourde japonaise *Venerupis philippinarum*. Sa : zone sub-articulaire, C : zone centrale, Pa : zone périphérique antérieure, Pv : zone périphérique ventrale, Pp : zone périphérique postérieure, S : zone sinusale. (D'après Paillard & Maes, 1994).

Ce découpage va permettre de différencier 7 stades de dépôt de conchioline (Conchiolin Deposit Stage : CDS), les dépôts bruns n'étant visibles à l'œil nu qu'à partir du stade 2 (Figure 17).

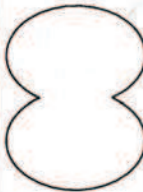






CDS	1	2	3	4	5	6	7
Symptômes							
	microscopique	visible à l'oeil nu					

Figure 17. Synthèse des stades de dépôts de conchioline (CDS) en fonction de l'expansion des dépôts de conchioline sur la face interne des valves de la palourde. (D'après Paillard & Maes, 1994).

5. 3. 4. 2. Les stades de réparation coquillière

Paillard et Maes (1994) ont également établi, dans un premier temps, 4 stades de réparation coquillière (Shell Repair Stage : SRS), c'est-à-dire de recouvrement des dépôts de conchioline par des couches calcifiées. Ainsi, un stade SRS 0 désigne des individus malades mais ne présentant aucun signe de réparation coquillière. Chez les individus présentant un stade SRS 1, les dépôts de conchioline sont recouverts par de petits amas calcifiés alors que chez des individus au stade SRS 2, ces amas sont plus importants et forment des plaques calcifiées. Un cinquième stade, le stade SRS 2,5, a été ajouté en 2004 (Paillard, 2004b). Il désigne des individus dont les dépôts bruns sont totalement recouverts par une couche calcifiée à l'exception de quelques points bruns encore visibles. Enfin, un stade SRS 3 désigne des individus présentant une réparation coquillière totale où les amas bruns ne sont visibles que par transparence à travers la nouvelle couche calcifiée.

5. 3. 5. Réponses physiologique et immunitaire de *V. philippinarum* face à la MAB

5. 3. 5. 1. Réponse physiologique face à la MAB

D'un point de vue physiologique la première conséquence de la maladie de l'anneau brun est une diminution du taux de croissance des individus (Paillard, 1992 ; Flye Sainte Marie *et al.*, 2007a, 2009b). Cela s'explique par le fait que la fixation de la bactérie au niveau de la lame périostracale de la palourde altère celle-ci. Or la lame périostracale est le siège de la biominéralisation. Ainsi, un animal atteint par la MAB va connaître un ralentissement, voire un arrêt, de croissance et des déformations de la coquille peuvent être observées notamment sur le bord externe des valves (Paillard, 2004a). L'indice de condition, à savoir le ratio entre poids sec de chair et le poids de la coquille, des animaux infectés se trouve également diminué par rapport aux individus sains (Flye-Sainte-Marie *et al.*, 2007a). L'infection de *V.*

philippinarum par *V. tapetis* entraîne également chez la palourde, un amaigrissement ainsi qu'une baisse de la teneur en glycogène dans les tissus (Plana, 1995 ; Plana *et al.*, 1996) c'est-à-dire une baisse des réserves énergétiques des organismes. Cette énergie qui n'est plus mise en réserve chez les organismes infectés est utilisée par la palourde notamment pour synthétiser la conchioline au niveau de la lame périostracale. D'un point de vue physiologique, la palourde une fois infectée, doit faire un compromis entre sa croissance, sa mise en réserve d'énergie, sa défense contre la bactérie pathogène et la réparation de ses tissus (Flye-Sainte-Marie *et al.*, 2009).

5. 3. 5. 2. Réponse immunitaire face à la MAB

5. 3. 5. 2. 1. Dans l'hémolymphe

Au niveau hémolympatique, la réponse immunitaire a principalement été étudiée suite à une inoculation de *V. tapetis* dans la cavité palléale. De cette manière, il a été montré qu'une injection de *V. tapetis* entraîne une augmentation rapide de la Concentration Hémocytaire Totale (CHT) dans l'hémolymphe avant une stabilisation plus ou moins longue (Oubella *et al.*, 1993, 1994, 1996). Les mêmes auteurs ont montrés que cette hémocytose s'accompagne d'une augmentation des granulocytes, d'une baisse des hyalinocytes et d'une augmentation de l'activité leucine aminopeptidase (LAP) (Oubella *et al.*, 1994). Une autre étude a démontré que l'augmentation des granulocytes observée est accompagnée par une augmentation de la phagocytose (Allam *et al.*, 2001). Par ailleurs, la présence de *V. tapetis* dans l'hémolymphe de la palourde provoque une perte des capacités d'adhérence des hémocytes car ces derniers perdent leurs filopodes et s'arrondissent (Choquet *et al.*, 2003). Récemment, il a été démontré que la production d'oxyde nitrique augmente dans l'hémolymphe en présence de *V. tapetis* et que cette augmentation est proportionnelle à la quantité de bactéries mises en présence (Jeffroy & Paillard, 2011). Une étude menée sur des palourdes issues du Golfe du Morbihan semble indiquer que des variations significatives du nombre d'hémocytes ne sont effectives que chez des palourdes présentant des stades de maladie supérieurs ou égaux à 4 (Flye Sainte Marie *et al.*, 2009).

5. 3. 5. 2. 2. Dans les fluides extrapalléaux

La comparaison des paramètres immunitaires de l'hémolymphe et des fluides extra-palléaux (FEP) montrent, qu'après une injection de *V. tapetis* dans la cavité palléale, la CHT augmente plus fortement dans les FEP que dans l'hémolymphe (Allam *et al.*, 2000a). Cependant, contrairement aux résultats obtenus dans l'hémolymphe, dans les FEP la concentration en protéines diminue après l'injection de *V. tapetis* dans la cavité palléale (Allam *et al.*, 2000a).

Les différentes études portant sur les FEP de *V. philippinarum* laissent penser que lors d'une infection par *V. tapetis*, les cellules immunitaires sont mobilisées vers les FEP qui sont physiquement proches du site de primo-infection (Allam *et al.*, 2000a, b, Allam *et al.*, 2001). L'effet de *V. tapetis* sur les hémocytes a été étudié, *in vitro*, chez d'autres espèces de bivalves et par rapport à *Mercenaria mercenaria* ou *Crassostrea gigas*, la mortalité des hémocytes est significativement plus importante chez *V. philippinarum* (Allam & Ford, 2006) ce qui met en avant une certaine spécificité de l'organisme pathogène pour son hôte. Ce résultat va dans le sens des résultats obtenus en comparant la CHT, le nombre de granulocytes, la mortalité, la concentration en protéines et l'activité du lysozyme de l'hémolymph et des FEP chez *V. philippinarum*, *V. decussata*, *M. mercenaria* et *C. virginica*. L'impact le plus important sur l'ensemble de ces paramètres immunitaires a été observé, *in vivo*, chez *V. philippinarum* (Allam *et al.*, 2006).

5. 4. Conclusion

La palourde japonaise a révélé, au moment de son introduction le long des côtes françaises, de meilleures performances de croissance que la palourde native *V. decussata*. Cependant, cette espèce introduite s'avère aujourd'hui plus sensible face à la maladie de l'anneau brun caractérisée par l'interaction avec la bactérie pathogène *V. tapetis*. Le développement de cette maladie au sein de la palourde peut conduire à la mort des individus. Le système immunitaire n'a alors pas été capable de contrer les effets de la bactérie. Afin de mieux comprendre pourquoi et comment l'interaction entre *V. philippinarum* et *V. tapetis*, en cas de développement de la maladie, tourne en la faveur du *Vibrio* il est primordial de mieux comprendre le système immunitaire de la palourde. De nombreuses études se sont penchées sur le rôle des hémocytes dans cette interaction mais, à ce jour, peu d'études se sont intéressées aux rôles et au fonctionnement du système PO chez la palourde japonaise. La preuve concrète d'un rôle de ce système enzymatique dans le développement de la maladie réside dans l'anneau brun formé de conchyoline qui est un dérivé de la mélanine. Le système PO, initiateur de la cascade à l'origine de la synthèse de la mélanine et de ses dérivés est donc, par conséquent, à l'origine du nom de cette maladie qu'est la maladie de l'anneau brun. En dehors de son implication dans la synthèse de l'anneau brun, le travail de cette thèse vise à caractériser d'un point de vue biochimique l'activité PO de *V. philippinarum* mais aussi à comprendre son implication et son rôle physiologique au sein du système immunitaire de l'organisme lorsque celui-ci est exposé à la bactérie pathogène *V. tapetis*.

Chapitre 2 :

Matériel et méthodes

Cette partie décrit les matériels, tant biologiques que chimiques, les méthodes et les procédés qui ont été utilisés pour atteindre les objectifs fixés précédemment.

Les différents produits testés, comme substrats ou inhibiteurs de l'activité phénoloxydase, proviennent de chez Sigma-Aldrich (France). Le réactif de Bradford, utilisé au cours des dosages de protéines totales ainsi que les colonnes et le matériel de chromatographie proviennent de chez Bio Rad France. Les résines de chromatographie utilisées au cours des étapes de purification proviennent quant à elles de chez GE Healthcare.

1. Matériel biologique : origines et acclimatation

Chaque expérimentation présentée est indépendante. C'est pourquoi l'origine et l'acclimatation des animaux peuvent différer d'une expérimentation à une autre.

1. 1. Caractérisation biochimique de l'activité PO et étude *in vitro* de l'effet d'ECPs sur l'activité PO de *V. philippinarum*

Pour les expérimentations de caractérisation biochimique de l'activité PO mais aussi pour l'étude de l'effet des ECPs sur l'activité PO, les palourdes ont été collectées dans un étang exploité par la SATMAR (Société Atlantique de MARiculture – SA) qui jouxte la nurserie de l'Ile Tudy, dans le sud Finistère (Figure 18). Pour les étapes de grossissement, les palourdes sont semées sur cet étang dont le sol est constitué d'un sédiment sablo-vaseux.



Figure 18. Localisation des installations vénériques de la SATMAR à l'Ile Tudy dans le Finistère sud en Bretagne (France) Source : Cartograf.fr.

Afin de réduire la variabilité interindividuelle et de réaliser l'ensemble des expérimentations sur un pool unique de matériel biologique pendant la durée de la thèse, l'hémolymph de plus de 400 individus a été collectée en décembre 2010.

Pour ce faire, les animaux, prélevés en milieu naturel, ont ensuite été transférés au laboratoire (LEMAR – Plouzané) où ils ont été maintenus dans un bac de 300 litres alimenté en eau de mer en provenance directe de la rade de Brest.

La taille moyenne des individus adultes de *Venerupis philippinarum* est de $42,79 \pm 2,23\text{mm}$ de l'extrémité postérieure à l'extrémité antérieure de l'animal (Figure 19). Dans l'ensemble des travaux présentés, la taille des individus fait référence à la longueur antéropostérieure plus ou moins l'écart type.

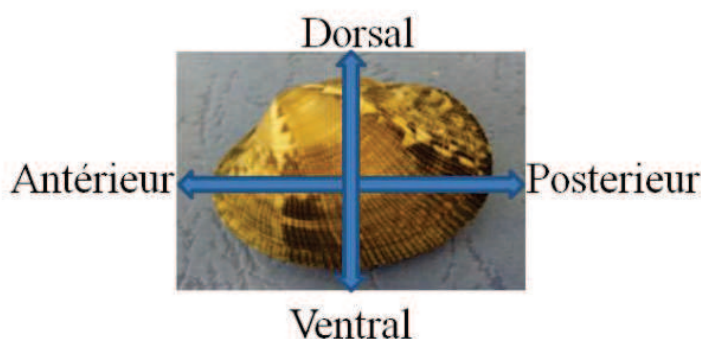


Figure 19. Orientation dorso-ventrale et antéropostérieure de la palourde japonaise *V. philippinarum*.

Les animaux ont été maintenus dans leur bac pendant 7 jours avant les prélèvements d'hémolymph (cf section 2.1. du chapitre 2).

1. 2. Etude de la réponse enzymatique à une exposition à *Vibrio tapetis* et à un challenge thermique chez *V. philippinarum*

Pour cette expérimentation, plus de 1100 individus de *V. philippinarum* ont été pêchés dans l'étang de la SATMAR à l'Ile-Tudy (Figure 18) le 5 octobre 2012. La taille moyenne de ces individus était de $39,62 \pm 2,29\text{mm}$. Ces animaux ont été transférés au laboratoire où ils ont été répartis dans différents bacs de 50L comme le montre la figure 20 et acclimatés à 15°C ou 22° C pendant une semaine avant le début de l'expérimentation.

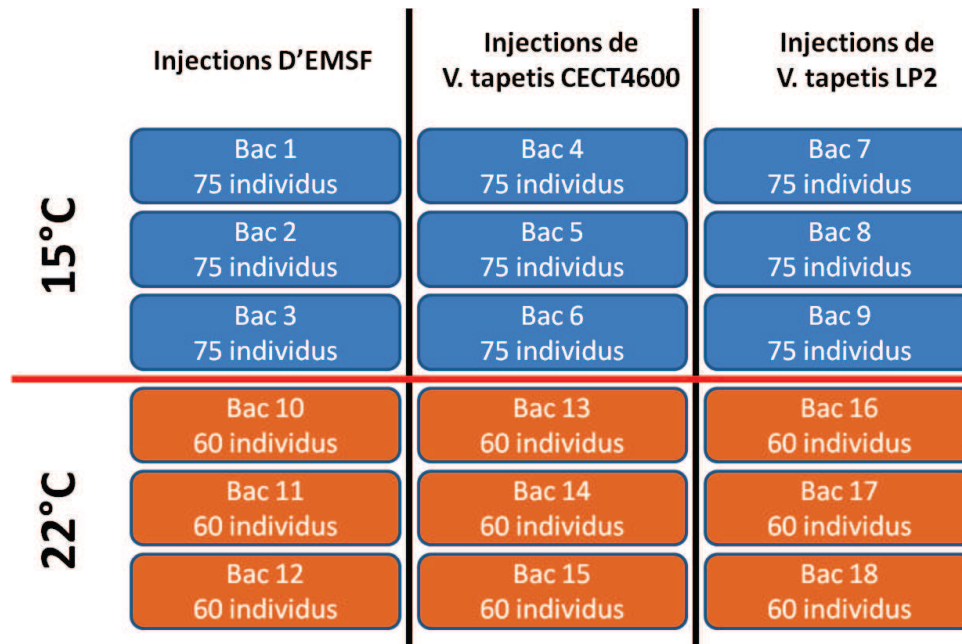


Figure 20. Dispositif expérimental mis en place afin d'étudier l'effet d'une injection de *V. tapetis* chez *V. philippinarum* à deux températures différentes. De l'eau de mer stérile filtrée (EMSF) a été injectée aux individus témoins, la souche *V. tapetis* CECT4600 a été injectée à un tiers des individus et la souche *V. tapetis* LP2 au tiers restant des individus. Chaque condition est étudiée en triplicatas. Les bacs représentés en bleu ont été maintenus à une température moyenne de $15,3 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ et les bacs représentés en orange ont été maintenus à une température moyenne de $22,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

1. 3. Recherche d'un cycle endogène au niveau des activités enzymatiques chez *V. philippinarum*

Pour cette expérimentation, menée en collaboration avec Gaëlle Richard, une centaine de palourdes japonaises, *Venerupis philippinarum*, nous ont été envoyées depuis le site de la SATMAR de Marennes en Charente Maritime. Ces animaux, nés à l'écloserie de Marennes, ont grandi dans les claires qui jouxtent l'écloserie. La taille moyenne de ces animaux était de $45,75 \pm 1,73\text{mm}$.

Ces animaux ont dans un premier temps été acclimatés, une semaine, dans un bac de 100L alimenté en eau de mer filtrée ($0,5\mu\text{m}$) à une température moyenne de $10,5^{\circ}\text{C}$. Le bac dans lequel ont été placés les animaux contenait du substrat sableux (Sable blanc fin, $0,5\text{mm}$, lavé à l'eau de mer et autoclavé) et recouvert d'une bâche en plastique noir opaque afin de créer l'obscurité totale pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. Le bac, contenant les animaux, était continuellement oxygéné via deux systèmes de bullages répartis à chaque

extrémité du bac et continuellement alimenté en eau de mer grâce à trois arrivées d'eau de mer réparties de façon homogène sur l'ensemble de la surface du bac.

1. 4. Comparaison de la pathogénicité de deux souches de *Vibrio tapetis* sur des populations japonaises de *V. philippinarum*

Ces expérimentations se sont déroulées à l'institut de recherche national d'aquaculture, à la station de Nansei, au Japon. Pour ces expérimentations, deux populations de palourdes ont été étudiées. La première population était issue de Matsusaka (M), au sud de l'île de Shikoku qui est l'île principale de l'archipel japonais (Figure 21). La seconde population était issue de l'île la plus au nord des quatre îles principales de l'archipel : Hokkaïdo et plus précisément de Akkeshi (A) qui se trouve sur la côte Est de l'île (Figure 21). La taille moyenne des animaux originaires de Matsusaka était de $41,77 \pm 2,70\text{mm}$ alors que celle des animaux originaires d'Akkeshi était de $34,24 \pm 1,63\text{mm}$.



Figure 21. Localisation des deux zones d'origine des populations de palourdes japonaise, *V. philippinarum*, étudiées. A : Akkeshi ; B : Matsusaka Source : Maximilian Dörrbecker.

Ces animaux ont été transportés à la station de Nansei qui se trouve à une trentaine de kilomètres au sud de Matsusaka. Les deux localités dont sont issues les deux populations étudiées présentent des différences climatiques relativement importantes. Ainsi, la température des eaux côtières dans la région d'Akkeshi était d'environ 10°C au moment des prélèvements alors que la température avoisinait les 20°C dans la région de Matsusaka.

L'ensemble des animaux a, dans un premier temps, été acclimaté progressivement à la température de 15°C pendant une semaine. Ensuite chacune des deux populations a été séparée en deux groupes : la première moitié a été maintenue à la température de 15°C alors que la seconde partie des individus a progressivement été acclimatée à une température de 20°C, le tout pour une période d'une semaine. Les individus ont alors été répartis dans différents bacs de 50L nommés de A à L, comme l'explique la figure 22, à raison de 110 individus par bac.

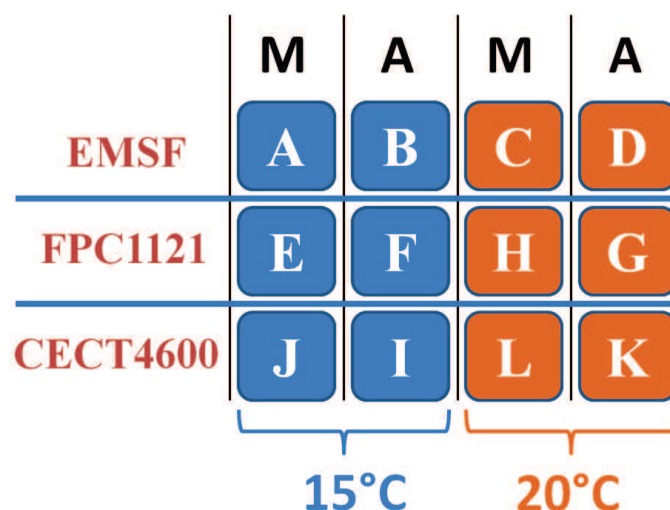


Figure 22. Répartition des individus dans les différents bacs (A à L) en fonction de leur zone d'origine (M = Matsusaka et A = Akkeshi), de leur température d'acclimatation (15 ou 20°C) et des injections reçus (EMSF = Eau de Mer Stérile Filtrée, FPC1121 = *V. tapetis* FPC1121 et CECT4600 = *V. tapetis* CECT4600).

1. 5. Caractérisation biochimique de l'activité PO chez *H. tuberculata*

Une démarche comparable à celle mise en œuvre pour les palourdes a été menée en mars 2012 sur 56 ormeaux fournis par France Haliotis (SCEA – Plouguerneu) et élevés en pleine mer à l'entrée de l'Aber Wrac'h dans le Finistère. Les animaux ont été transférés au laboratoire où ils ont été maintenus dans un bac de 300 litres alimenté, en circuit ouvert, en eau de mer prélevée directement en rade de Brest. La taille moyenne des animaux était de $57,59 \pm 3,19$ mm ce qui est inférieur à la taille réglementaire de pêche qui est de 90mm selon l'axe antéropostérieur de l'animal. Les animaux ont ainsi été maintenus 7 jours dans leur bac avant les prélèvements d'hémolymphe.

2. Prélèvements des fluides et tissus

Tout au long de la thèse, l'ensemble des échantillons, constitué des fluides ou des tissus prélevés, a été conservé à -80°C jusqu'à son utilisation pour les dosages d'activité enzymatiques et les dosages de concentration en protéines totales.

2. 1. Prélèvements des fluides chez *V. philippinarum*

Pour chacune des expérimentations, l'hémolymphe des animaux a été prélevée dans le muscle adducteur postérieur à l'aide de seringues stériles d'un millilitre montées d'aiguilles stériles 25G (0,5 × 16mm) (Figure 23). L'hémolymphe, une fois prélevée, a été immédiatement centrifugée pendant 10 minutes, à 785g et 4°C, afin de séparer les fractions cellulaires et acellulaires. Pour chaque expérimentation, les dosages enzymatiques et protéiques ont été effectués sur la fraction acellulaire de l'hémolymphe.

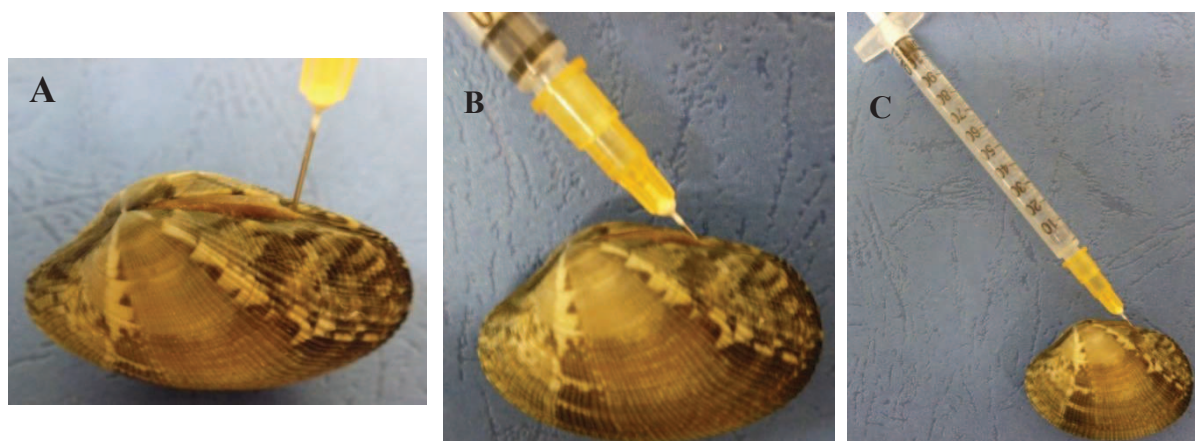


Figure 23. Prélèvement d'hémolymphe sur une palourde japonaise. (A) L'aiguille est insérée en arrière du ligament en position postéro-dorsale. (B) L'aiguille est orientée vers l'extrémité postérieure de l'animal de façon à atteindre le muscle adducteur. (C) En moyenne, 1mL d'hémolymphe est prélevé dans le muscle adducteur postérieur d'une palourde japonaise adulte.

Lorsque les fluides extrapalléaux ont été prélevés, cela s'est fait après le prélèvement de l'hémolymphe des organismes et l'ouverture des valves. Une fois l'animal ouvert, il est vidé de son eau palléale puis une aiguille stérile, préalablement courbée, est insérée sous les siphons afin d'atteindre le compartiment extrapalléal périphérique puis central (Figure 24) sans perforer le manteau qui sépare la cavité palléale de la cavité extrapalléale.



Figure 24. Prélèvement des fluides extrapalléaux totaux sur une palourde japonaise adulte. L'aiguille stérile est insérée dans la cavité extrapalléale (périphérique, centrale et subarticulaire) en passant sous les siphons de l'animal puis en traversant les muscles palléaux au niveau de la ligne palléale de l'animal.

Tout comme pour l'hémolymphe, les fluides extrapalléaux ont été immédiatement centrifugés après prélèvement pendant 10 minutes, à 785g et 4°C afin de séparer les fractions cellulaires et acellulaires. Pour chaque expérimentation, les dosages enzymatiques et protéiques ont été effectués sur la fraction acellulaire des fluides extrapalléaux.

2. 2. Prélèvement des tissus chez *V. philippinarum*

Le manteau des animaux a été disséqué après prélèvement des fluides extrapalléaux. Les échantillons de manteaux ont été immédiatement plongés dans l'azote liquide puis broyés à froid à l'aide d'un broyeur Retsch MM 400. Le broyat de manteaux est ensuite remis en suspension dans 500µL de tampon de lyse (Corporeau *et al.*, 2012 ; Guévelou *et al.*, 2013). Le broyat resuspendu est ensuite homogénéisé par passage à l'Ultra-Turrax (Modèle PRO 200) puis centrifugé à 10 000g pendant 45 minutes à 4°C. Les dosages enzymatiques et protéiques ont été réalisés sur le surnageant de lysat de manteau.

Lorsque les branchies étaient prélevées, celles-ci étaient immédiatement plongées dans l'azote liquide. Le traitement des échantillons était ensuite le même que pour les échantillons de manteau et, tout comme pour le manteau, les dosages ont été réalisés sur le surnageant de lysat de branchies.

2. 3. Prélèvement de l'hémolymphe chez *H. tuberculata*

L'hémolymphe de chaque ormeau a été prélevée dans le sinus artériel céphalique, qui est localisé dans la partie antérieure du muscle, à l'aide de seringues stériles de 2mL surmontées d'aiguilles stériles 25G (0,5 × 16mm). L'ensemble de l'hémolymphe ainsi prélevée a ensuite

été poolée puis centrifugée pendant 10 minutes à 785g, à 4°C. Les différents dosages ont été réalisés sur la fraction acellulaire ainsi obtenue, c'est-à-dire sur le sérum d'hémolymphe des animaux.

3. Dosage des protéines totales

La concentration en protéines totales des différents échantillons a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), à l'aide du réactif Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio Rad France), lequel est dilué au quart puis filtré avant son utilisation. L'ensemble des dosages de protéines a été réalisé dans des microplaques, 96 puits, à fond plat de marque Greiner (Greiner – 96F – Bottom).

Ainsi 200µL de réactif dilué sont ajoutés à 10µL d'échantillon dont on souhaite doser la concentration en protéines totales. Après une incubation de 30 minutes à une température de 20°C, l'absorbance des échantillons est lue à une longueur d'onde de 620nm. Toutes les mesures sont réalisées en triplicatas.

Une gamme (Figure 25), dont les concentrations en protéines totales varient de 0,031 à 1mg.mL⁻¹, a été réalisée pour chaque dosage effectué, à partir d'albumine de sérum bovin (BSA). Un blanc contenant 10µL d'eau de mer stérile filtrée (EMSF) ainsi qu'un blanc contenant 10µL de tampon ont systématiquement été réalisés.

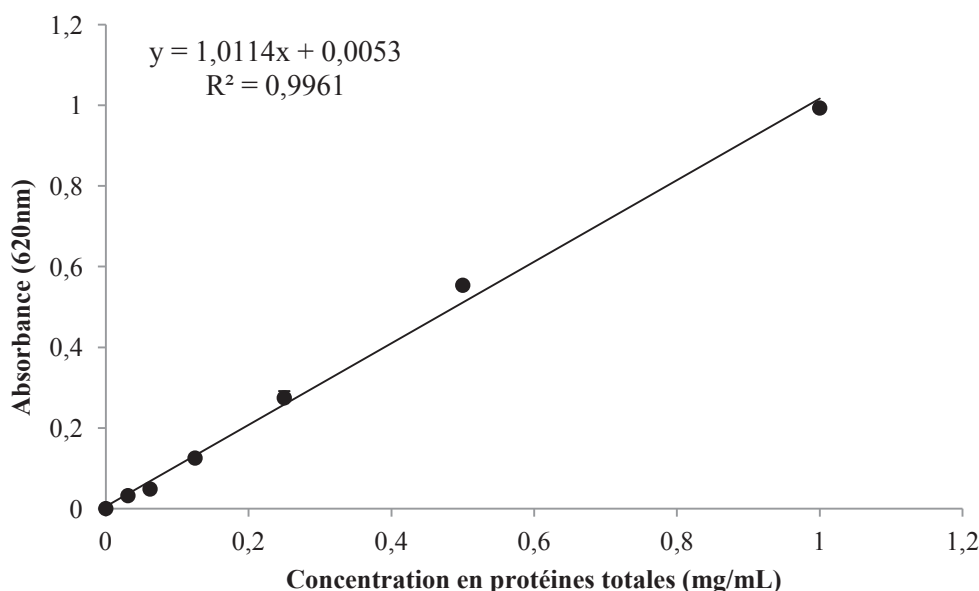


Figure 25. Droite de régression linéaire, et son équation, obtenues pour la gamme de concentrations en protéines totales réalisée à partir d'albumine de sérum bovin (Moyenne \pm écart-type).

4. Protocole optimisé de dosage de l'activité phénoloxydase

4. 1. Principe de la mesure

La méthode est basée sur la quantification de l'oxydation d'un substrat par l'enzyme. Cette oxydation est suivie au cours du temps, ce qui présente l'avantage de s'assurer, pour chaque mesure, que l'enzyme catalyse la réaction en conditions de vitesse initiale. Afin de maintenir les conditions de vitesse initiale, il est important que le substrat ne soit pas le réactif limitant au cours de la réaction. Aussi, un travail préliminaire a été réalisé afin de déterminer la concentration saturante en substrat. L'ensemble des dosages d'activité phénoloxydase a été réalisé dans des microplaques, 96 puits, à fond plat de marque Greiner (Greiner – 96F – Bottom). L'utilisation des microplaques apporte divers avantages dont le principal est la faible quantité de réactifs nécessaires, notamment les volumes de solution enzymatique qui n'excédaient pas 50µL par puits.

Les mesures d'absorbances sont réalisées sur un lecteur de microplaques POLARstar OMEGA de (BMG Labtech) thermorégulé à 25°C, piloté par le logiciel Omega Version 3.00 R2.

4. 2. Choix du tampon utilisé

Le maintien du pH à une valeur constante est primordial lorsqu'on étudie une activité enzymatique. En effet, au cours d'une réaction enzymatique, la concentration en ions hydrogènes peut considérablement varier. Dans le même temps, un nombre important de protons peuvent être consommés ou relâchés dans le milieu réactionnel. Le rôle du tampon est donc de stabiliser la concentration en ions hydrogènes tout en n'interférant pas avec la fonction de l'enzyme étudiée. Des tests préliminaires nous ont amenés à choisir le tampon Tris(hydroxyméthyl)aminométhane communément appelé Tris-HCl, pour la gamme de pH retenue pour l'étude.

4. 3. Composition du milieu réactionnel

Les dosages d'activité phénoloxydase ont été réalisés d'après le protocole utilisé par Reid et collaborateurs (2003) avec quelques modifications. Le milieu réactionnel « de base », pour les différents dosages d'activité phénoloxydase, est constitué de trois réactifs dans les proportions suivantes :

-50µL de solution enzymatique (Sérum d'hémolymphe ou de fluides extrapalléaux ou surnageant de broyat de tissus selon les expérimentations)

-50µL de tampon Tris-HCl 0,1M pH 8,2

Ce mélange réactionnel est alors incubé durant 10 minutes à 25°C avant l'ajout de

-100µL de substrat dilué dans de l'eau ultra pure

Après une brève agitation de 3 secondes afin d'homogénéiser le milieu réactionnel, la lecture d'absorbance est réalisée à la longueur d'onde adaptée au substrat utilisé. Les cinétiques enzymatiques sont suivies sur des périodes allant de 30 à 45 minutes.

Pour chacun des dosages réalisés, des « contrôles tampons », contenant 50µL d'eau ultra pure à la place des 50µL de tampon Tris-HCl, ainsi que des « contrôles substrats », contenant 100µL d'eau ultra pure à la place des 100µL de substrat, ont été effectués.

L'oxydation spontanée du substrat (i.e. autooxydation) a également été quantifiée en remplaçant les 50µL de solution enzymatique par 50µL d'eau ultra pure. Ces valeurs d'autooxydation ont systématiquement été soustraites des valeurs obtenues en présence de solution enzymatique afin de ne considérer que l'oxydation du substrat causée par la catalyse enzymatique.

Pour les solutions enzymatiques, les contrôles et les blancs, les dosages ont systématiquement été réalisés en triplicatas afin de réduire la variabilité.

Lorsque le dosage de l'activité était effectué en présence d'un inhibiteur, celui-ci était directement dilué dans le tampon Tris-HCl.

4. 4. Calcul de l'activité volumique

L'activité enzymatique a été calculée en se basant sur l'augmentation du taux absorbance (A) par minute obtenu à partir de la pente de la partie linéaire de l'absorbance en fonction du temps. Cette linéarité, nécessaire au calcul des valeurs d'activité, est représentative des conditions de vitesse initiale de la catalyse enzymatique. L'unité internationale d'enzyme (UI) est la quantité d'enzyme capable de transformer, dans des conditions données de pH et de température, une micromole de substrat par minute. Il faut, dans ces conditions, que le substrat reste en excès tout le long de la mesure.

Le calcul de l'activité enzymatique est basé sur la loi de Beer-Lambert selon laquelle :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \times l \times C$$

Où « A_{λ} » est l'absorbance mesurée à la longueur d'onde égale à λ , elle s'exprime sans unité.

« ε » est le coefficient d'extinction molaire (ou absorbance molaire) et s'exprime en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

La grandeur « l » est la longueur du trajet optique, en cm.

« C » est la concentration molaire de la solution en $mol.L^{-1}$.

Si on applique cette relation au cours du temps, on obtient la relation suivante :

$$\Delta A.min^{-1} / \varepsilon_{\lambda} = \Delta C.min^{-1}$$

Cette relation permet donc d'établir une correspondance entre une variation d'absorbance par minute et une transformation du substrat par minute.

Le coefficient d'extinction molaire, ϵ , est connu pour certains substrats utilisés au cours de ces expérimentations (L-Dopa, Dopamine par exemple (Espín *et al.*, 2000)) ce qui nous a permis d'exprimer une partie des résultats en unités internationales. Cela dit, la valeur de ce coefficient molaire n'est pas connue pour tous les substrats utilisés. Le choix a donc été fait, lorsque différents substrats sont utilisés, de conserver une unité arbitraire afin de pouvoir comparer les résultats d'un substrat à l'autre.

Pour notre étude l'activité volumique a été calculée de la manière suivante :

$$\text{Activité volumique (U.mL}^{-1} \text{ d'enzyme)} = ((\Delta A - \Delta A_{\text{autoox}}) / T) \times V_t / V_e \times Fd$$

Où « ΔA » est la différence d'absorbance au cours du temps pour l'échantillon testé, « ΔA_{autoox} » est la différence d'absorbance pour les blancs où les 50 μ L de solution enzymatique ont été remplacés par 50 μ L d'eau extra pure. « T » est la durée en minutes au cours de laquelle l'absorbance est suivie. « V_t » est le volume total du milieu réactionnel (soit 200 μ L pour notre étude) et « V_e » est le volume de solution enzymatique (soit 50 μ L dans notre étude). « Fd » est le facteur de dilution qui permet d'obtenir un résultat par millilitre d'enzyme et non pas pour 50 μ L d'enzyme (1mL / 50 μ L = 20).

Concrètement notre calcul d'activité volumique est donc donné par la formule suivante :

$$A_{\text{vol}} (\text{U.mL}^{-1} \text{ d'enzyme}) = ((\Delta A - \Delta A_{\text{autoox}}) / T) \times 80$$

L'activité spécifique est alors obtenue en divisant la valeur de l'activité volumique par la concentration en protéines totales en mg.mL⁻¹. On obtient alors une activité spécifique en unité arbitraire, U, par mg de protéines.

5. Autres dosages enzymatiques

Les dosages d'activités superoxyde dismutase et catalase ont été réalisés en collaboration avec Gaëlle Richard selon des protocoles précédemment optimisés .

5. 1. Dosage de l'activité superoxyde dismutase

Le dosage d'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD) totale, basé sur la méthode de McCord et Fridovich (1969), est une mesure indirecte puisque l'on mesure l'inhibition compétitive de la xanthine oxydase (XO) par la SOD (Figure 26).

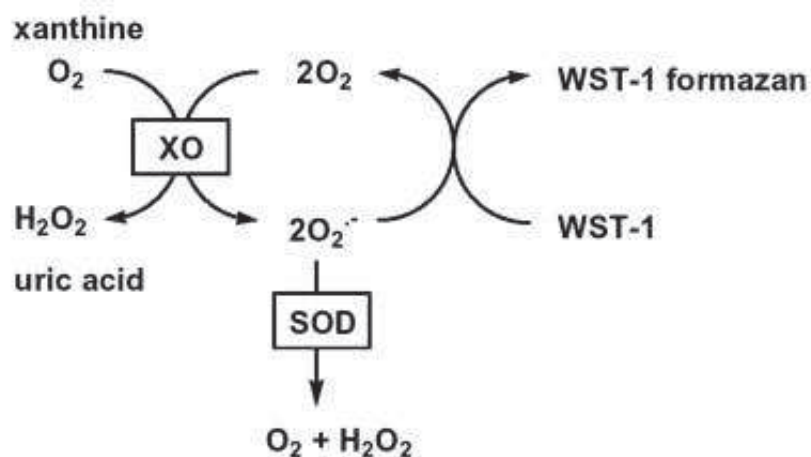


Figure 26. Principe du dosage de la SOD (SOD kit Assay, SIGMA)

Pour ce dosage, un kit (SOD Assay Kit, SIGMA) a été utilisé et l'absorbance des milieux réactionnels a été lue par le lecteur de microplaque POLARstar Omega (BMG LABTECH) à 440nm après une incubation de 20 minutes à 25°C. La gamme étalon, allant de 0,01 à 10U.mL⁻¹, a été réalisée en utilisant la SOD d'érythrocytes bovins (SIGMA) comme standard. L'activité spécifique de l'enzyme est ensuite calculée pour chaque échantillon, en rapportant l'activité en U.mL⁻¹ à la quantité de protéines totales, et exprimée en U.mg⁻¹ de protéines. L'unité de l'activité, U, est définie comme étant la concentration en SOD entraînant une inhibition de 50% du complexe xanthine oxydase (XO)/xanthine.

5. 2. Dosage de l'activité catalase

L'activité de la catalase (CAT) dans le tissu branchial de palourde a été mesurée selon la méthode décrite par Aebi (1984). Il s'agit de suivre par spectrophotométrie la disparition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) causée par l'activité de la CAT. Un suivi cinétique de 1 minute et 30 secondes avec un pas de 9 secondes entre chaque mesure d'absorption a donc été effectué pour chaque échantillon en triplicata. L'absorption des échantillons dans l'UV a été mesurée au moyen d'un spectrophotomètre à cuve (Libra S12, BIOCHROM) à une longueur d'onde de 240 nm et d'une cuve en quartz de longueur 1 cm. La solution de peroxyde d'hydrogène a été préparée dans du tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 10mM (pH=7,4), étant donné qu'au-delà de cette concentration, un rapide déclin de la constante cinétique de la réaction a été observé par Aebi (1984). (Le surnageant a été dilué au 1/200 dans la solution de PBS).

L'activité CAT des individus est ensuite calculée selon l'équation:

$$\Delta A_i / \Delta T = \varepsilon(H_2O_2).l.[CAT]_i$$

avec A_i : Absorbance pour l'individu i , T : Durée totale de la cinétique (90 secondes), $\epsilon_{H_2O_2}$: coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène ($39,4 \text{ L.mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), l : longueur de la cuve (ici, 1cm) et $[CAT]_i$: l'activité de la CAT pour l'individu i en $\text{mmol.L}^{-1}.\text{sec}^{-1}$.

L'activité est par la suite normalisée par la quantité de protéines totales de chaque échantillon et est finalement exprimée en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}\text{mg}$ de protéines ou U CAT.mg^{-1} de protéines.

6. Substrats et inhibiteurs de l'activité phénoloxydase

6. 1. Substrats

Une large gamme de substrats potentiels d'une ou plusieurs sous-classes de phénoloxydases a été testée. Ces substrats ont été répertoriés dans la littérature comme étant des substrats potentiels de phénoloxydases chez les champignons, les végétaux ou les animaux. L'oxydation de ces substrats entraîne la formation de divers dérivés mélaniques. L'absorbance à laquelle est mesurée la formation de ces composés est donc fonction du substrat oxydé. Le tableau 4 présente les différents substrats testés, leur synonyme ou abréviation et les longueurs d'onde associées aux mesures réalisées. Parmi ces composés, des substrats de différentes natures existent. Les ortho-diphénols (o-diphénols) peuvent être oxydés par les 3 sous-classes de phénoloxydases, les monophénols ne peuvent être oxydés que par les tyrosinases alors que les para-diphénols (p-diphénols) ne peuvent être oxydés que par les laccases. Les laccases sont aussi capables d'oxyder des métoxyphénols ainsi que certains composés non phénoliques. Les catécholoxydases, quant à elles, sont capable d'oxyder les o-diphénols, lesquels peuvent être également oxydés par les tyrosinases et les laccases ce qui explique pourquoi il n'y a pas ici de substrats spécifiques aux catécholoxydases.

Tableau 4. Synthèse des différents substrats potentiels testés avec leurs abréviations et/ou leurs synonymes associés. La nature et la spécificité sont précisées pour chacun des substrats ainsi que la longueur d'onde utilisée pour détecter leur oxydation.

Spécificité du substrat	Nature du substrat	Nom	Abréviation ou synonyme couramment utilisé	Longueur d'onde (nm)
Non-spécifique	O-diphenol	L-3,4-dihydroxyphénylalanine	L-DOPA	492
		3,4-Dihydroxyphenethylamine hydrochloride	Dopamine hydrochloride	492
		Acide 3,4-dihydroxyphényl propionique	DHPPA	400
		Pyrocatechol	Catéchol	405
Tyrosinase	Monophénol	4-hydroxyanisole	4-HA	492
		Acide propionique(S)-2-Amino-3- (4-hydroxyphenyl)	L-Tyrosine	492
		acide p-hydroxyphényl propionique	PHPPA	492
Laccase	Non-phénolique	P-phénylènediamine	PPD	420
		o-phénylènediamine	OPD	420
	Métoxyphénol	4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine	Syringaldazine	525
		Acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique	ABTS	420
	P-diphénol	1,4-Dihydroxybenzene	Hydroquinone	390

Les solutions des différents substrats ont été préparées dans de l'eau ultra pure à l'exception des solutions syringaldazine, de PPD et d'OPD qui ont été préparées dans du méthanol.

6. 2. Calcul des constantes cinétiques

Pour une enzyme de type michaelienne, V_{\max} est la vitesse maximale et K_m est la constante de Michaelis. K_m correspond à la concentration en substrat pour laquelle la moitié des sites actifs sont occupés. K_m est également une mesure de stabilité du complexe enzyme substrat et est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Ainsi une valeur de K_m élevée révèle une liaison faible entre l'enzyme et son substrat, autrement dit une affinité faible de l'enzyme pour son substrat.

V_{\max} , la vitesse maximale, correspond au turnover de l'enzyme, c'est-à-dire au nombre de molécules de substrat transformées en produit par unité de temps, à condition que l'enzyme soit saturée en substrat.

Ces deux grandeurs peuvent aisément être calculées à partir des vitesses de réaction V à différentes concentrations en substrat ($[S]$) lorsque l'enzyme agit selon le schéma simple donné par l'équation de Michaelis-Menten. Ainsi la représentation de $1/V$ en fonction de

$1/[S]$, appelée représentation de Lineweaver-Burk, donne une droite dont l'ordonnée à l'origine est égale à $1/V_{\max}$ et dont la pente est égale à K_m/V_{\max} (Figure 26).

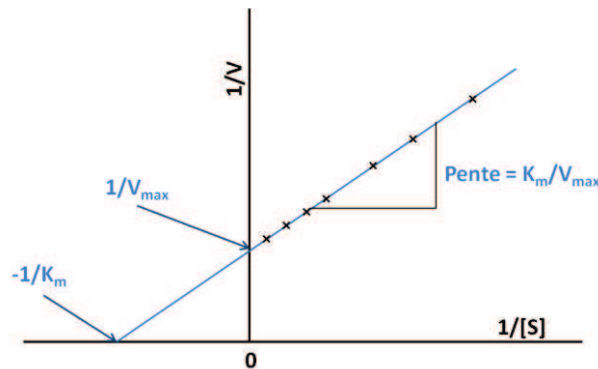


Figure 27. Représentation de Lineweaver-Burk ou représentation en double inverse pour une enzyme de type michaelienne. L'ordonnée à l'origine est égale à $1/V_{\max}$ et la pente est égale à K_m/V_{\max} .

Certains substrats peuvent, dans certains cas, agir comme des inhibiteurs. En effet, une molécule de substrat peut se fixer au site actif de l'enzyme. Certains substrats, lorsqu'ils se trouvent en excès dans le milieu réactionnel, peuvent alors se fixer au complexe enzyme-substrat déjà formé et le rendre inactif. On parle alors d'inhibition par excès de substrat et au-delà d'une certaine concentration en substrat, l'activité enzymatique ne va plus augmenter ni se stabiliser mais va diminuer. Dans ce cas la représentation de Lineweaver-Burk est une hyperbole dont l'asymptote oblique, dont la pente est égale à K_m/V_{\max} , coupe l'axe $1/[S]$ en un point $-1/K_m$. Il est également possible de calculer la constante d'inhibition du substrat en représentant l'inverse de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat (Figure 28). La droite obtenue coupe l'axe $[S]$ en $-K_i$ ou K_i est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat.

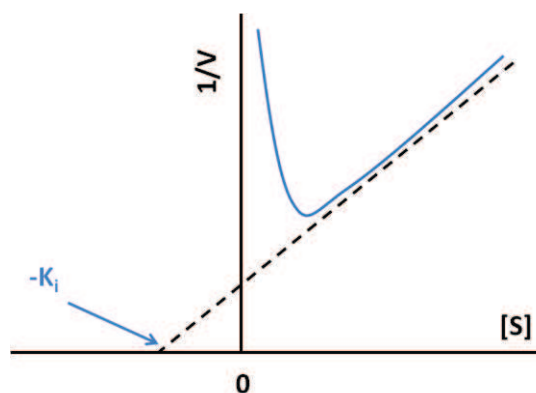


Figure 28. Représentation de $1/V$ en fonction de $[S]$ pour une enzyme michaelienne inhibée par un excès de substrat. La droite obtenue coupe l'axe $[S]$ en $-K_i$ ou K_i est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat.

6. 3. Inhibiteurs

Différents inhibiteurs, répertoriés dans la littérature comme étant des inhibiteurs potentiels d'une ou plusieurs sous-classes de phénoloxydases chez différentes espèces fongiques, animales ou végétales, ont été testés au cours de cette étude. Le tableau 5 regroupe l'ensemble des inhibiteurs potentiels testés, leur spécificité, les différents noms qui y sont associés ainsi que la liste, non exhaustive, des publications référençant leur utilisation comme inhibiteur de l'activité phénoloxydase.

Tableau 5. Synthèse des différents inhibiteurs potentiels testés, des abréviations ou synonymes utilisés dans notre étude.

Spécificité	Nom utilisé dans cette étude	Autres noms utilisés	Références
Non-spécifiques	EDTA	Acide éthylènediamine tétra-acétique	Arias <i>et al.</i> , 2003 ; Cong <i>et al.</i> , 2005 ; Liu <i>et al.</i> , 2006 ; Aladaileh <i>et al.</i> , 2007 ; Fan <i>et al.</i> , 2009 ; Huang <i>et al.</i> , 2010 ; Zibae <i>et al.</i> , 2011 ;
	Acide kojique	5-hydroxy-2,4-pyrone	Faure <i>et al.</i> , 1995 ; Montero <i>et al.</i> , 2001 ; Luna-Acosta <i>et al.</i> , 2010
	Acide citrique		Yang <i>et al.</i> , 2000 ; Montero <i>et al.</i> , 2001, 2004 ; Liu <i>et al.</i> , 2006 ; Fan <i>et al.</i> , 2009 ;
	PMSF	Fluorure de phénylméthanésulfonyle	Ballarin <i>et al.</i> , 1998 ; Aladaileh <i>et al.</i> , 2007 ; Luna-Acosta <i>et al.</i> , 2010 ; Giménez <i>et al.</i> , 2010 ; Manikandan & Ramar., 2012
	Acide benzoïque		Montero <i>et al.</i> , 2001 ; Cong <i>et al.</i> , 2005 ; Liu <i>et al.</i> , 2006 ; Xue <i>et al.</i> , 2007 ; Fan <i>et al.</i> , 2009
	Tropolone	2-Hydroxy-2,4,6-cycloheptatrien-1-one	Faure <i>et al.</i> , 1995 ; Arias <i>et al.</i> , 2003 ; Newton <i>et al.</i> , 2004 ; Aladaileh <i>et al.</i> , 2007 ; Hellio <i>et al.</i> , 2007 ; Butt & Raftos, 2008 ; Martínez-Alvarez <i>et al.</i> , 2008 ; Fan <i>et al.</i> , 2009 ; Thomas-Guyon <i>et al.</i> , 2009
	Isopropanol	Alcool isopropylique ; propan-2-ol	García-Carreño <i>et al.</i> , 2008
	PTU	1-phényl-2-thiourée ; Phénylthiourée ; Phénylthiocarbamide	Hattori <i>et al.</i> , 2005 ; Siddiqui <i>et al.</i> , 2006 ; Aladaileh <i>et al.</i> , 2007 ; Hellio <i>et al.</i> , 2007 ; Brack <i>et al.</i> , 2008 ; Pang <i>et al.</i> , 2010 ; Luna-Acosta <i>et al.</i> , 2010 ; Lacoue-Labarthe <i>et al.</i> , 2009 ;
	Thiourea	Thiourée ; thiocarbamide	Gollas-Galván <i>et al.</i> , 1999 ; Cong <i>et al.</i> , 2005 ; Liu <i>et al.</i> , 2006 ; Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 2008 ; Fan <i>et al.</i> , 2009
Catécholase et Tyrosinase spécifiques	SHAM	Acide salicylhydroxamique ; Acide 2-hydroxybenzoïque	Allan & Walker, 1988 ; Dawley & Flurkey, 1993 ; Faure <i>et al.</i> , 1995 ; Aladaileh <i>et al.</i> , 2007 ; Flurkey <i>et al.</i> , 2008 ; Luna-Acosta <i>et al.</i> , 2010
	4-Hr	4-hexylrésorcinol ; 4-hexyl-1,3-dihydroxybenzène	Montero <i>et al.</i> , 2001 ; Mendes <i>et al.</i> , 2006 ; Zavarzina & Zavarzin, 2006 ; Martínez-Alvarez <i>et al.</i> , 2008 ; Luna-Acosta <i>et al.</i> , 2010
Laccase spécifique	CTAB	Céthyltriméthylammonium bromide	Walker & McCallion, 1980 ; Dawley & Flurkey, 1993 ; Luna-Acosta <i>et al.</i> , 2010 ;

6. 3. 1. Maximum d'inhibition et IC_{50}

Pour chaque inhibiteur testé, un effet dose a été appliqué dans le but de déterminer le maximum d'inhibition et ce pour les conditions décrites précédemment (50 μ L d'enzyme, 50 μ L de tampon et 100 μ L de substrat). Cela correspond à la concentration en inhibiteur pour laquelle on obtient l'inhibition maximale de l'activité phénoloxydase. Les activités ainsi obtenues ont été exprimées en pourcentage d'activité en considérant que l'activité en l'absence d'inhibiteur était égale à 100% d'activité.

L'effet dose appliqué a également permis de calculer l' IC_{50} qui est la concentration en inhibiteur pour laquelle on obtient 50% d'inhibition de l'activité enzymatique. Cette valeur a pu être calculée pour tous les inhibiteurs à l'exception de l'HBHZ pour lequel le maximum d'inhibition était inférieur à 50%. Ces deux grandeurs que sont le maximum d'inhibition et l' IC_{50} permettent de comparer l'efficacité relative de chaque inhibiteur sur l'activité phénoloxydase.

6. 3. 2. Étude du type d'inhibition

En fonction de leurs modes d'action et de l'endroit sur lequel ils se fixent, par rapport au site actif, différents types d'inhibiteurs sont identifiables et leurs effets sur les valeurs de K_m et de V_{max} varient (Tableau 6). Ainsi, si un inhibiteur se fixe indifféremment à l'enzyme seule ou au complexe enzyme-substrat, il est dit non-compétitif simple ou non-compétitif pur. S'il ne se fixe que sur le complexe enzyme-substrat, il est dit incompétitif. Si un inhibiteur se fixe directement sur l'enzyme seule, au niveau du site catalytique, il est dit compétitif et dans ce cas le substrat et l'inhibiteur s'excluent mutuellement. L'inhibition mixte est une généralisation des inhibitions précédemment énoncées. L'inhibiteur peut se fixer sur l'enzyme libre ou sur le complexe enzyme-substrat mais avec des affinités différentes.

Afin de déterminer quel mécanisme d'inhibition était exercé par chacun des inhibiteurs testés, l'activité phénoloxydase a été testée pour une concentration en inhibiteur donnée à des concentrations en substrats différentes. La concentration en inhibiteur a été choisie, pour chaque inhibiteur, égale ou proche de la valeur de l' IC_{50} . Ces mesures permettent de calculer les valeurs des constantes cinétiques en présence de l'inhibiteur. Les valeurs de K_m et de V_{max} calculées en présence d'inhibiteur sont alors appelées K_{mapp} (app : apparent) et V_{maxapp} . Ces valeurs permettent ensuite de calculer, pour chaque inhibiteur, la constante de dissociation K_i . Cette valeur, qui traduit l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme, est égale à la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites actifs est occupée et est exprimée en mole par litre.

Ainsi, K_i , qui correspond également à la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur, est inversement proportionnelle à l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme.

Tableau 6. Différents types d'inhibition et effets sur les valeurs des constantes cinétiques K_m et V_{max} ou $[I]$ est la concentration en inhibiteur testé.

Type d'inhibition	Effet sur la valeur de V_{max}	Effet sur la valeur K_m	Valeur de V_{maxapp}	Valeur de K_{mapp}
Non-compétitif simple	\searrow	Pas d'effet	$V_{max} / (1 + ([I]/k_i))$	K_m
Incompétitif	\searrow	\searrow	$V_{max} / (1 + ([I]/k_i))$	$K_m / (1 + ([I]/K_i))$
Compétitif	Pas d'effet	\nearrow	V_{max}	$K_m (1 + ([I]/K_i))$
Mixte	\searrow	\searrow		
Mixte	\searrow	\nearrow		

7. Optimum thermique, thermostabilité et pH optimal

7. 1. Température optimale de l'activité phénoloxydase

Afin de déterminer la température optimale de la phénoloxydase de *V. philippinarum*, un milieu réactionnel composé de 50 μ L de sérum, 50 μ L de tampon Tris-HCl (0,10 M ; pH 8.0) et de 100 μ L de L-DOPA (0,04M) a été incubé à différentes températures allant de 3 à 73°C. L'activité phénoloxydase spécifique a ensuite été calculée pour les différentes températures testées. Des milieux réactionnels dans lesquels les 50 μ L de sérum ont été remplacés par 50 μ L d'eau ultra pure ont également été incubés aux différentes températures afin de mesurer l'autooxydation du substrat et de soustraire les valeurs obtenues aux valeurs mesurées en présence du sérum. Cela a permis d'éliminer tout biais potentiel dus à une autooxydation du substrat en fonction de la température.

7. 2. Thermostabilité de l'enzyme

La thermostabilité de l'enzyme, quant à elle, a été déterminée en incubant, pendant 30 minutes, du sérum seul, à différentes températures comprises entre 2 et 60°C. A l'issue de ces 30 minutes d'incubation, les tubes contenant le sérum ont été immédiatement placés dans la glace, les mélanges réactionnels (50 μ L de sérum, 50 μ de tampon Tris-HCl (0,10M ; pH 8,0) et 100 μ L de L-Dopa (0,04M)) ont ensuite été réalisés et l'activité phénoloxydase calculée dans les conditions habituelles c'est-à-dire à 25°C.

7. 3. pH optimal de l'activité phénoloxydase

Afin d'évaluer l'impact du pH sur l'activité phénoloxydase, et plus particulièrement de déterminer le pH optimal de l'enzyme, 50µL d'hémolymphe ont été ajoutés à 50µL de tampon Tris-HCl à différentes valeurs de pH comprises entre 7,65 et 9,15 pour *Venerupis philippinarum* et comprises entre 7,0 et 10,0 pour *Haliotis tuberculata*. L'ensemble a été incubé 10 minutes à 25°C puis 100µL de L-DOPA, 0,04M, ont été ajoutés. Les mesures d'activités phénoloxydases ont ensuite été réalisées comme précédemment.

8. Purification partielle de la phénoloxydase

Dans le but de purifier partiellement la phénoloxydase de *Venerupis philippinarum*, différentes techniques de chromatographie à basse pression ont été testées. Pour toutes les expérimentations de chromatographie, une pompe péristaltique (Gilson Minipuls 3) a été utilisée afin d'imposer le débit de sortie de colonne. Par ailleurs un collecteur de fractions (Gilson FC 203B) a complété le dispositif de sortie de colonne afin d'obtenir des fractions de volume constant. L'ensemble des chromatographies a été réalisé en chambre froide, à une température comprise entre 4 et 6°C afin d'éviter la dégradation des protéines.

8. 1. Chromatographie d'exclusion stérique

Cette technique de chromatographie, aussi appelée chromatographie de filtration sur gel ou encore tamisage moléculaire permet de séparer les molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Une colonne « SEPHACRYL S-100 » (GE Healthcare ; domaine de fractionnement de 10-100KDa) a été coulée. Cette colonne (18,5cm × 3cm), d'un volume de 85mL est capable de séparer les protéines ayant un poids moléculaire inférieur à 100KDa. Le tampon d'équilibration ainsi que le tampon d'élution utilisés était du tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 et le débit moyen de la colonne, imposé par la pompe péristaltique était de 36,96mL.h⁻¹. Sur cette colonne, un échantillon de 0,8mL de sérum concentré 10,45 fois (par passage sur unité d'ultrafiltration 10,000 NMWL, AmiconTM) a été déposé et 80 fractions de 1,5mL ont été collectées.

Différents marqueurs de taille, de poids moléculaire compris entre 6,5 et 66 KDa ont été passés, l'objectif étant de calibrer la colonne et d'obtenir une droite d'étalonnage du logarithme du poids moléculaire en fonction du volume d'élution. Le tableau 7 présente les différents marqueurs de taille ainsi que leur poids moléculaire.

Tableau 7. Protéines utilisées comme marqueurs de taille (Sigma-Aldrich) pour l'étalonnage de la colonne de chromatographie SEPHACRYL S-100.

Protéines	Poids moléculaire (KDa)
Aprotinine de poumon de bœuf	6,5
Cytochrome C de cœur de cheval	12
Anhydrase carbonique d'érythrocyte de boeuf	29
Albumine de sérum bovin	66

8. 2. Chromatographie d'échange ionique

Une colonne, échangeuse d'anions, de type DEAE-SEPHAROSE (GE Healthcare) a été utilisée. Pour cette colonne (7cm × 2cm), d'un volume de 22mL l'équilibration a été réalisée par le passage de 24mL de tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 jusqu'à ce que le pH et la conductivité en entrée et en sortie de colonne soient identiques. Après dépôt de 1,4ml d'échantillon un gradient de chlorure de sodium a été appliqué grâce au tampon d'élution qui était du Tris-HCl 0,1M pH 8,2 NaCl 0,2 à 1M (par pas de 0,2M et par volume de 5mL à chaque fois). Quarante fractions de 1,5mL chacune ont ainsi été collectées à un débit moyen de 53,40mL.h⁻¹.

8. 3. Dosages post-chromatographie

Les protéines ont été détectées par lecture directe d'absorbance dans l'ultraviolet. Cent microlitres de chacune des différentes fractions collectées sont déposés sur microplaques 96 puits à fond plat sont déposés et l'absorbance est lue respectivement à 220 et à 280nm. La lecture à 220 permet de détecter la liaison peptidique alors que la lecture à 280nm, quant à elle, permet de détecter les acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane) contenus dans les protéines. Ces lectures d'absorbances ont été faites, comme précédemment, sur le lecteur de microplaques POLARstar OMEGA de chez BMG Labtech.

L'activité phénoloxydase a ensuite été mesurée sur les différentes fractions, afin de détecter les fractions actives, dans les conditions décrites dans la section 4 du chapitre 2. Les fractions présentant une activité phénoloxydase sont alors considérées comme les fractions actives.

Une fois ces données réunies, il est possible de réaliser le chromatogramme représentant les absorbances à 220 et 280nm ainsi que l'activité phénoloxydase en fonction du volume d'élution. Les fractions actives ont ensuite été poolées, la teneur en protéines totales a été dosée par la méthode de Bradford (cf section 3 chapitre 2). Les fractions actives ont, au besoin, été concentrées sous vide par passage au SpeedVac (1heure à 25°C).

9. Electrophorèse bidimensionnelle (selon Artigaud et al., 2013)

Afin de confirmer les résultats obtenus par chromatographie d'exclusion stérique mais aussi pour connaître le point isoélectrique de l'enzyme étudiée, une électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée avec les fractions actives concentrées issues de la chromatographie d'exclusion stérique. En effet, l'électrophorèse bidimensionnelle permet une séparation des protéines en deux temps : l'isoélectrofocalisation (IEF) sépare les protéines en fonction de leur point isoélectrique puis une migration en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide sépare les protéines, perpendiculairement à l'IEF, en fonction de poids moléculaire.

Outre l'intérêt de confirmer le poids moléculaire de l'enzyme et de connaître le point isoélectrique de celle-ci, l'intérêt est avant tout d'isoler la protéine dans un espace à deux dimensions créé par un gradient de pH (première dimension) et un gradient de poids moléculaire (deuxième dimension).

9. 1. Réhydratation des strips

Dans l'IPG box (Immobilized pH gradient) 250µL d'échantillon ont été déposés puis les strips (13cm, pH3-10, BioRad France) ont été disposés sur ces échantillons en tournant le côté recouvert de gel vers l'échantillon. L'IPG box est ensuite refermée et les strips se réhydratent pendant 12 heures.

9. 2. 1^{ère} dimension

La première dimension, c'est-à-dire la séparation des protéines selon un gradient de pH, est réalisée dans un système « ETTAN IPGphor 3 ». Les strips, précédemment réhydratés sont disposés, côté gel vers le haut, sur le « Manifold » dans le système. L'extrémité de chaque strip est imbibée de 150µL d'eau ultra pure puis, après avoir vérifié que les électrodes sont bien en contact avec l'appareil et l'extrémité des gels, les strips sont recouverts d'huile minérale. Le programme présenté dans le tableau 8 est ensuite appliqué.

Tableau 8. Programme appliqué aux strips pour la 1^{ère} dimension

Etape 1	Voltage constant	150V	03h00	0,45kV.h ⁻¹
Etape 2	Augmentation progressive	500V	00h30	0,20kV.h ⁻¹
Etape 3	Voltage constant	500V	00h30	0,25kV.h ⁻¹
Etape 4	Augmentation progressive	1000V	01h00	0,80kV.h ⁻¹
Etape 5	Augmentation progressive	8000V	02h30	11,3kV.h ⁻¹
Etape 6	Voltage constant	8000V	02h00	16kV.h ⁻¹
Etape 7	Voltage constant	500V	20h00	10kV.h ⁻¹

9. 3. Equilibration

Dans l'IPG box, les strips sont ensuite recouverts de 12mL de tampon d'équilibration (Annexe) et 120 mg de Dithiothréitol (DTT) qui a pour action de couper les ponts disulfures les transformant en groupement sulfhydryles. Le tout est ensuite agité pendant 10 minutes. Puis, les puits de l'IPG box sont vidés et les strips sont recouverts par 12mL de tampon d'équilibration contenant 576 mg d'iodoAcétate dont l'action est de transformer les groupements sulfhydryles en carboxyméthylcystéine. Le tout est à nouveau laissé 10 minutes sous agitation.

9. 4. 2^{ème} dimension

La préparation des gels et des cuves d'électrophorèse est détaillée en annexe 1.

Juste avant de déposer les strips sur les gels, de l'agarose 1% est coulé sur le haut des gels afin d'assurer un bon contact. Les strips peuvent ensuite être déposés en prenant garde que le contact avec le gel se fasse sur toute la longueur du strip. Les cuves sont ensuite remplies de tampon Tris-Glycine-SDS (TGS ; cf composition en annexe) 1X alors que la partie supérieure des cuves est remplie de TGS 2X. La migration est, dans un premier temps, lancée à 10mA par gel jusqu'à ce que tout ait bien pénétré dans le gel. Le courant est ensuite augmenté à 30mA par gel pour un temps de migration total d'environ 6 heures.

Les spots obtenus par électrophorèse bidimensionnelle sont ensuite excisés du gel, lavés au bicarbonate d'ammonium (BICAM) puis digérés par trypsinisation en milieu basique (environ 14 heures à 37°C). Les peptides ont ensuite été extraits du gel par une succession de déshydrations / réhydratations à l'aide d'acétonitrile (ACN), d'une solution de BICAM 50 mM et d'acide formique 5%. Après séchage au Speed-Vac, les peptides ont été repris dans l'acide trifluoroacétique (TFA ; 0,1% dans l'eau MilliQ) et déposé sur une cible en acier avec un mélange d'acide α -Cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA, 10 mg/ml). Ils ont ensuite été

analysés par spectrométrie de masse en tandem (Autoflex III, Bruker Daltonic) à ionisation laser assistée par matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation : MALDI) couplé à un analyseur à temps de vol (Time Of Flight : TOF) (Plateforme de spectrométrie de masse de l'UBO – Brest).

10. Diagnostic de la maladie de l'anneau brun

Pour effectuer un diagnostic complet de la maladie de l'anneau brun, deux paramètres peuvent être évalués. Le premier est le stade de développement de l'anneau brun et le second est le stade de réparation de l'anneau brun, ces deux paramètres peuvent être quantifiés en se basant sur la classification établie par Paillard et Maes (1994).

10. 1. Les stades de maladie

Les stades de maladie, également appelés stade de dépôt de conchioline (CDS Conchiolin Deposit Stage), sont fonction de l'extension et de l'épaisseur du dépôt brun de conchioline en se basant sur la division des valves indiquée par la figure 29.

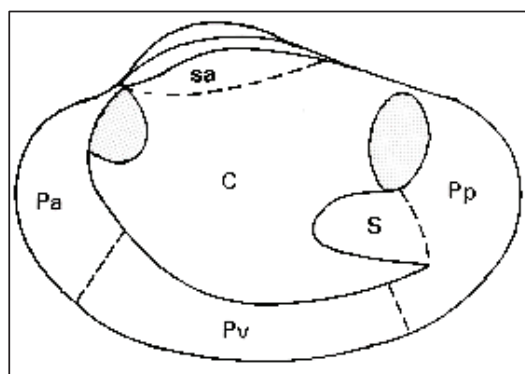


Figure 29. Découpage de la face interne d'une valve de palourde japonaise *Venerupis philippinarum*. sa : zone sub-articulaire, C : zone centrale, Pa : zone périphérique antérieure, Pv : zone périphérique ventrale, Pp : zone périphérique postérieure, S : zone sinusale. Paillard & Maes, 1994).

L'échelle de classification se compose de 7 stades de maladies, les individus étant stade 0 sont des individus sains. Le stade 1 correspond à des palourdes ne présentant que des points de conchioline microscopiques. Pour les stades supérieurs à 1, les dépôts sont visibles à l'œil nu et la valeur du stade de maladie augmente avec l'extension et l'épaisseur des dépôts de conchioline comme le montre la figure 29.

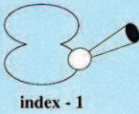






















Système de classification AB				
STADE 1 (index -19 to -1)	 Visible au microscope index -1			
STADE 2 (index 0 - 2)	 index 1	 index 2	 index 2	 index 2
STADE 3 (index 3 - 4)	 index 3	 index 4	 index 4	 index 4
STADE 4 (index 5 - 6)	 index 5	 index 6	 index 5	 index 6
STADE 5 (index 7 - 8)	 index 7	 index 8	 index 8	
STADE 6 (index 9 - 10)	 index 9	 index 10	 index 10	
STADE 7 (index 11 - 19)	 index 11	 index 12	 index 14	 index 18

Figure 30. Classification des symptômes de la Maladie de l'Anneau Brun établie par Paillard et Maes (1994) en fonction du nombre d'aires touchées par les dépôts de conchioline et de l'étendue de celles-ci.

10. 2. Les stades de réparation coquillière

Pour évaluer la réparation coquillière (Shell Repair Stage SRS), c'est-à-dire la recalcification par-dessus les dépôts de conchioline, il existe cinq stades. Un stade SRS 0 correspond à un individu malade ne présentant aucun signe de réparation. Les individus SRS 1 présentent des petits points calcifiés sur les dépôts de conchioline. Pour des individus SRS 2, la réparation est plus avancée et ce ne sont plus de simples points mais des plaques calcifiées qui recouvrent les dépôts bruns. Des animaux SRS 2,5 présentent des dépôts de conchioline entièrement recalcifiés à l'exception de quelques points bruns persistants (Stade de réparation

ajouté ultérieurement, Paillard, 2004b). Enfin des palourdes présentant un stade SRS 3 sont des animaux dont la coquille est entièrement « réparée » : les dépôts bruns sont totalement recouverts et s'ils sont visibles, ce n'est que par transparence à travers la couche calcifiée.

11. Souches bactériennes

Au cours des différentes expérimentations trois souches bactériennes différentes de *Vibrio tapetis* ont été utilisées :

-*V. tapetis* CECT4600, isolée chez *V. philippinarum* en octobre 1990 à Landéda (Bretagne, France) au cours des premiers épisodes de mortalités associés à la maladie de l'anneau brun (Paillard *et al.*, 1994, 1995 ; Borrego *et al.*, 1996).

-*V. tapetis* LP2, isolée chez le crénilabre *Symphodus melops* en 2003 en Norvège (Jensen *et al.*, 2003).

-*V. tapetis* FPC1121, isolée chez *V. philippinarum* en 2008 au Japon (Matsuyama *et al.*, 2010).

11. 1. Mise en culture des différentes souches bactériennes utilisées

Pour les différentes expérimentations les souches bactériennes ont été mises en culture en milieu liquide. Ainsi, 5mL de milieu Zobell (dont la composition est détaillée dans le tableau 9) ont été inoculés avec chacune des souches conservées à -80°C, puis incubés pendant 12 heures, à 18°C sous agitation (1900rpm).

Tableau 9. Composition du milieu de culture utilisé pour chacune des souches bactériennes étudiées.

Contenu (g)	Pour un volume final de 1L
Pastone	4
Extrait de levure	1
Phosphate ferrique	0,1
Sea Salts	30

La concentration des solutions bactériennes ainsi obtenues ont été déterminées selon la relation suivante :

$$[C] = DO \times 1,3 \times 10^9 - 3,6 \times 10^7$$

Où [C] est la concentration bactérienne en unité formant une colonie et DO est la densité optique à 490nm.

11. 2. Récupération des produits extracellulaires (Extra-Cellular Products: ECP) bactériens

La méthode utilisée pour obtenir les ECPs des souches étudiées est inspirée des travaux réalisés par Liu et collaborateurs (1957). Pour ce faire, un milieu Zobell Agar est préparé en respectant les mêmes proportions de chaque produit que pour le milieu Zobell liquide (Tableau 9) et en y ajoutant, pour un litre de milieu 15g de Pastagar. Le milieu, après avoir été autoclavé, est coulé dans des boîtes de Pétri de forme carrée et laissé sous hotte à flux laminaire ou il devient solide. Un film de cellophane, préalablement autoclavé, est ensuite étalé sur le milieu de culture solidifié afin de recouvrir totalement celui-ci. 2mL de culture bactérienne sont ensuite étalés sur le film de cellophane à l'aide d'un râteau stérile. Un temps de contact de 10 minutes suffit pour que les bactéries pénètrent à travers le film. Puis les boîtes de Pétri sont retournées et placées à l'étuve pendant 48 heures à 18°C. Après cette période d'incubation, les films de cellophane sont rincés avec du tampon Tris-HCl (0,1M ; pH8,2) sans que le tampon n'entre en contact direct avec le milieu de culture. L'eau de rinçage, contenant les ECPs est récupérée puis centrifugée à 10 000g pendant 30 minutes à 4°C afin de culoter les débris les bactéries ainsi que le milieu de culture résiduel. Le surnageant obtenu est ensuite filtré à 0,22µm.

12. Analyses statistiques

12. 1. PCNM (Principal Coordinates of Neighbour Matrices)

Afin de déterminer si les activités enzymatiques PO, SOD et CAT dans les branchies et dans le sérum d'hémolymphe suivaient des cycles journaliers endogènes, nous avons utilisé comme technique d'analyse statistique la PCNM ou « Principal Coordinates of Neighbour Matrices ». Cette méthode de décomposition spectrale de séries spatio-temporelles a été mise au point par Borcart et Legendre (2002).

Concept

À partir d'une matrice de voisinage (obtenue à partir des données temporelles), dont on extrait les vecteurs propres, on cherche à modéliser la corrélation spatiale ou temporelle présente dans le jeu de données à différentes échelles. Cette technique permet, contrairement à l'analyse de Fourier, d'utiliser des données où quelques valeurs sont manquantes (dispositif non équilibré) mais également d'utiliser les vecteurs obtenus comme variables indépendantes dans d'autres méthodes d'analyse statistique comme les régressions linéaires multiples. L'analyse PCNM génère des vecteurs propres et valeurs propres ayant la forme de sinusoides

associées à des périodes décroissantes. Il s'agit ensuite de sélectionner les coordonnées principales des vecteurs utiles pour la modélisation, i.e., les vecteurs dont les valeurs propres sont positives (les seules ayant un sens biologique : vecteurs témoignant d'une auto-corrélation positive, i.e., deux valeurs d'une variable consécutives dans le temps seront proches). Enfin, la dernière partie de l'analyse consiste à partitionner la variation multivariable du jeu de données par les variables explicatives que sont le temps et les données environnementales :

- 1) Analyse du modèle : variables réponses = $f(\text{données temporelles, données environnementales})$ (significativité évaluée par une analyse de la variance ANOVA)
- 2) Représentation de la partition de la variance du modèle
- 3) Recherche de la période de la variation du jeu de données si le modèle est significatif et qu'une part de la variation est expliquée par les données temporelles

Dans le cadre de notre étude, nous avons testé le modèle :

$Y = f(X, E)$ où Y constitue la matrice des variables réponses (activités SOD, CAT, PO dans les branchies et l'hémolymphes) ; X constitue la matrice des vecteurs propres associés aux valeurs propres positives issus de l'analyse PCNM ; E constitue la matrice des variables environnementales (température, salinité, concentration en O_2 dissout).

Ce test a été effectué grâce aux scripts développés par Olivier Gauthier et Pierre Legendre sur le logiciel de statistiques R.

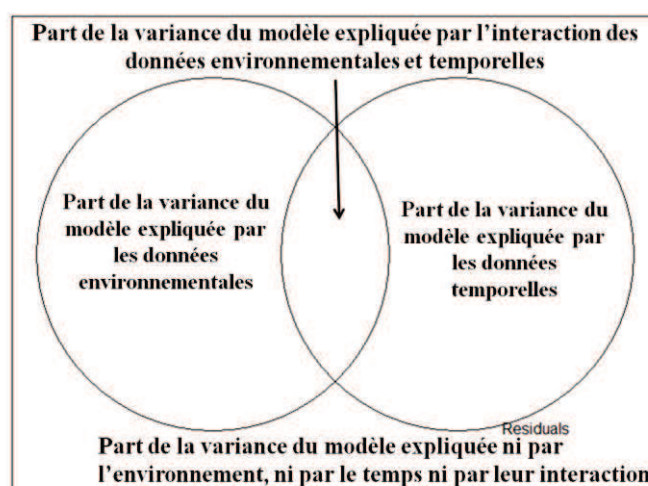


Figure 31. Représentation de la méthode statistique de la PCNM : « Principal Coordinates of Neighbour Matrices »

12. 2. Analyse des corrélations

Des analyses de corrélation entre les activités enzymatiques spécifiques, phénoloxydase (PO) et Superoxyde Dismutase (SOD) et les concentrations en protéines associées ont été

effectuées afin d'évaluer les relations entre ces deux variables. L'intérêt étant d'observer une évolution commune de type monotone, et non particulièrement une relation linéaire, le test utilisé ici a été le test de corrélation de Spearman.

12. 3. ANOVA Split-plot et Split-split-plot

12. 3. 1. *Enzymatic activities associated with Vibrio tapetis infection in the manila clam, Venerupis philippinarum*

Une analyse de la variance (ANOVA), pour un plan d'expérience en parcelles divisées à deux facteurs (ou split-plot), a été menée pour chaque tissu afin de déterminer des différences dans les contenus protéiques et dans les activités PO et SOD en fonction des conditions d'injection (effet fixe à trois niveaux : EMSF, LP2 et CECT4600) et du temps de prélèvement (effet fixe à six niveaux : 0h, 36h, 72h, 7j, 14j et 30j après injection) ainsi que leur interaction. Chaque bloc ou unité de réplication pour cette analyse était constitué par trois bacs correspondant aux grandes parcelles (EMSF, LP2 et CECT4600). Ces grandes parcelles ont elles-mêmes été divisées en sous-parcelles correspondant aux temps de prélèvement ou temps post-injection (p.i.).

Enfin, une analyse de la variance (ANOVA) pour un plan d'expérience en parcelles divisées à trois facteurs (ou split-split-plot) a été menée afin de déterminer des différences dans les contenus protéiques et les activités PO et SOD en fonction de la condition d'injection (effet fixe à trois niveaux : EMSF, LP2 et CECT4600), du tissu prélevé (effet fixe à trois niveaux : manteau, hémolymphes et fluides extrapalléaux) et du temps de prélèvement (effet fixe à six niveaux : 0h, 36h, 72h, 7j, 14j et 30j après injection) ainsi que leurs interactions. Les caractéristiques de cette analyse sont similaires à celles de la précédente excepté que les sous-sous-parcelles correspondent aux tissus prélevés (manteau, hémolymphes et fluides extrapalléaux). Cette seconde ANOVA a été faite afin de caractériser l'effet du tissu et de ses interactions avec le temps p.i. et l'injection sur les différentes variables mesurées.

La fonction « aov » du logiciel R a été utilisée afin de fournir le modèle linéaire pour l'analyse de la variance. Lorsque des différences significatives ont été observées, un test post-hoc de Tukey a été effectué pour déterminer quelles moyennes étaient significativement différentes. Les postulats de normalité et d'homoscédasticité des résidus du modèle ont été vérifiés graphiquement. Lorsque cela a été nécessaire, les variables explicatives ont été transformées ($\log x + 1$) afin de satisfaire ces postulats.

Toutes les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel R (version 2.15.3 ; R Core team, 2013), en utilisant les packages « Stats » (R Core team, 2013) et « TukeyC » (Faria *et al.*, 2012).

12. 3. 2. Combined effect of temperature and virulence of two *Vibrio tapetis* strains on phenoloxidase and superoxide dismutase activities during disease development in the manila clam, *Venerupis philippinarum*

Une analyse de la variance (ANOVA) pour un plan d'expérience en parcelles divisées à trois facteurs (ou split-split-plot) a été menée pour chaque tissu afin de déterminer des différences dans les contenus protéiques et les activités PO et SOD en fonction de la température (effet fixe à deux niveaux : 15°C et 22°C), de la condition d'injection (effet fixe à trois niveaux : EMSF, LP2 et CECT4600) et du temps de prélèvement (effet fixe à trois niveaux : 0h, 36h et 30j après injection) ainsi que leurs interactions. Chaque bloc ou unité de réplification pour cette analyse était constitué par neuf bacs correspondant aux grandes parcelles (15°C et 22°C). Ces grandes parcelles sont elles-mêmes divisées en sous-parcelles correspondant aux conditions d'injection. Enfin, ces sous-parcelles sont divisées en sous-sous-parcelles correspondant aux temps de prélèvement ou temps post-injection (p.i.).

La fonction « aov » du logiciel R a été utilisée afin de fournir le modèle linéaire pour l'analyse de la variance. Lorsque des différences significatives ont été observées, un test post-hoc de Tukey a été effectué pour déterminer quelles moyennes étaient significativement différentes. Les postulats de normalité et d'homoscédasticité des résidus du modèle ont été vérifiés graphiquement. Lorsque cela a été nécessaire, les variables explicatives ont été transformées ($\log x + 1$) afin de satisfaire ces postulats.

12. 4. Régression logistique

Pour les analyses de diagnostic de Maladie de l'Anneau Brun (MAB), i.e. les indices MAB et de Réparation de l'Anneau Brun (RAB), qui sont des données catégorielles (qualitatives) à plus de deux niveaux, une régression logistique multinomiale a été effectuée en utilisant la fonction « multinom » du logiciel R. Le modèle utilisé dans cette analyse a pris en compte le nombre de palourdes associé à chaque classe de MAB et de RAB comme étant fonction de la température, de la condition d'injection et de leur interaction (effets fixes). Les différences significatives pour chaque condition ont été calculées à l'aide de tests du rapport des vraisemblances (statistique du χ^2).

Ces analyses ont été effectuées avec le logiciel de statistiques R (version 2.15.3) en utilisant les packages « Stats », « TukeyC », « nnet » et « car ».

Chapitre 3 :

**Caractérisation biochimique
d'une activité laccase dans
l'hémolymphe de la palourde
japonaise *Venerupis philippinarum*
et de l'ormeau européen
*Haliotis tuberculata***

1. Introduction

Parmi les différents composants de la réponse humorale du système immunitaire des invertébrés, le système phénoloxydase (PO) est aujourd'hui considéré comme un élément clé de la défense (Söderhäll *et al.*, 1994 ; Söderhäll & Cerenius, 1998 ; Cerenius & Söderhäll, 2004 ; Cerenius *et al.*, 2008). Le terme "phénoloxydase" peut porter à confusion étant donné que sous cette dénomination sont regroupées trois sous-classes d'enzymes : les tyrosinases (E.C. 1.14.18.1), les catéchol oxydases (1.10.3.1) et les laccases (1.10.3.2). Les POs, sont des oxydoréductases qui vont oxyder différents composés phénoliques pour aboutir à la formation de quinones instables qui sont des composés dérivés de la mélanine. La mélanine, ainsi que ses dérivés, possèdent des propriétés fongicides, bactéricides, antivirales et joue donc un rôle primordial au sein de l'immunité des invertébrés (Cerenius & Söderhäll, 2008).

2. Caractérisation biochimique de l'activité PO dans l'hémolymphe de *Venerupis philippinarum*

L'étude du système PO peut donc permettre de comprendre le fonctionnement du système immunitaire de la palourde japonaise en réponse à une infection par *V. tapetis* et, en cas de développement de la MAB, comprendre comment et pourquoi la bactérie pathogène parvient à dominer le système immunitaire de son hôte. Cependant, pour interpréter et comprendre la réponse de ce système enzymatique à une infection bactérienne, il est nécessaire de connaître et de caractériser ce système immunitaire en conditions « normales », c'est-à-dire en l'absence d'infection. Cette connaissance se traduit, en premier lieu, par la caractérisation biochimique du système enzymatique et par la définition des sous-classes d'enzymes impliquées chez cette espèce. Ainsi, l'objectif de cette étude est de caractériser l'activité PO dans le sérum d'hémolymphe de *V. philippinarum* notamment en définissant quels types de substrats ce système enzymatique est capable d'oxyder, en déterminant quels sont les composés capables d'inhiber cette activité PO, dans quelles mesures et par le biais de quels mécanismes. L'objectif de ces expérimentations est également de définir quelles sont les conditions optimales, de température et de pH, pour l'activité du système PO mais aussi de définir la température au delà de laquelle l'enzyme est dénaturée.

Article 1. Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: characterization and kinetics properties



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi

Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties

Cédric Le Bris*, Christine Paillard, Valérie Stiger-Pouvreau, Fabienne Guérard

UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER, LEMAR-IUEM-UBO, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest Iroise – rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2013

Received in revised form

28 August 2013

Accepted 2 September 2013

Available online xxx

Keywords:

Venerupis philippinarum

Phenoloxidase

Laccase

Substrates

Inhibitors

ABSTRACT

The phenoloxidases (POs) include tyrosinases (EC 1.14.18.1), catecholases (EC 1.10.3.1) and laccases (EC 1.10.3.2) and are known to play a role in the immune defences of many invertebrates. For the Manila clam, *Venerupis philippinarum*, the exact role is not known, especially with regard to defences against Brown Ring Disease (BRD), which leads to high mortalities along European coasts. In order to understand the role and functioning of PO in *V. philippinarum*, the first step, and aim of this study, was to biochemically characterize the PO activity in the circulating hemolymph. Various substrates were tested and the common PO substrates L-DOPA, Catechol and dopamine exhibited good affinity with the enzyme and consequent low K_m values (3.75, 1.97, 4.91 mM, respectively). A single tyrosinase-specific substrate, PHPPA, was oxidized, but the affinity for it was low ($K_m = 47.33$ mM). Three tested laccase-specific substrates were oxidized by *V. philippinarum* PO (PPD, OPD and hydroquinone) and affinity was higher than for PHPPA. The results obtained with the substrate were confirmed by the use of different inhibitors: CTAB, a laccase-specific inhibitor inhibited PO activity greatly but not completely, whereas 4-Hr, specific to catecholases and tyrosinases, inhibited PO activity to a lesser extent. The results lead us to conclude that *V. philippinarum* PO activity in the circulating hemolymph, is mainly a laccase-like activity but there is also a smaller-scale tyrosinase-like activity. The inhibition mechanisms were also determined using dose–response substrate concentration for an inhibitor concentration equal or close to the IC50. Optimal conditions for the enzyme activity were also determined using L-DOPA as substrate, showing that its optimal temperature and pH are around 40 °C and 8.4 respectively. The enzyme is denatured for temperatures above 50 °C.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The high commercial value of Manila clam, *Venerupis philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) has made it the second most important aquaculture species in the world, after the oyster *Crassostrea gigas* [1]. Currently, world production of the species exceeds three million tonnes per year [2] and the main producer is China, accounting for 97.4% of total annual production [3]. *V. philippinarum* native to the Indo-Pacific region and was introduced to French coasts from the Pacific coast of North America in 1972. SATMAR (Société Atlantique de MARiculture) made these introductions for aquaculture purposes, as Manila clam has faster growth than the endemic European clam *Venerupis decussata* [4]. Natural reproduction also promoted its geographical expansion along European coasts. In 1987, mass mortalities of cultured clams occurred in

Landéda (North Finistère, Brittany, France), which was the most important production site in France [5]. Mortalities events were then reported along the Atlantic coast in France and in different countries in Western Europe and decimated stocks where the species had been introduced. They were found to be associated with the Brown Ring Disease (BRD) caused by the pathogenic bacterium *Vibrio tapetis* [6].

V. tapetis penetrates into the space between the mantle and the shell of the clam and progression of the disease results in the colonization of the shell matrix by *V. tapetis*. The development of the pathogen in the peripheral extrapallial compartment leads to the inhibition of normal shell biomineralization. This inhibition results in the formation of a brown deposit of melanised shell matrix on the peripheral inner surface of the valves [7–9]. BRD is also associated with a significant decrease in condition index [10] and a significant decrease in glycogen reserves [11,12].

Invertebrates do not have adaptive immune systems and therefore do not have antibodies, but will respond with other defence mechanisms when challenged by a pathogen. Among

* Corresponding author.

E-mail address: cedric.lebris@univ-brest.fr (C. Le Bris).

these biological defence processes, the pathogen could instead be: phagocytosed by hemocytes or killed by antimicrobial proteins, products of reactive oxygen species or quinones resulting from the melanisation cascade [13,14]. Because of its fungistatic, bacteriostatic and antiviral properties, melanin is a key component of the invertebrate immune system [15]. Melanin, whose synthesis is generally initiated by the formation of tyrosine, is the product of a series of enzymatic and non-enzymatic reactions. During this synthesis pathway, different toxic melanin derivatives could be produced, such as semi-quinones, dopaquinone and indole-quinones [16]. Among the enzymes whose actions result in the production of melanin, phenoloxidases (PO) play a key role. In fact, POs are copper-binding enzymes that convert phenolic substances to unstable quinones. Then, the quinones are non-enzymatically polymerized into melanin [17,18]. The activation of the melanisation cascade is relatively complex and is not as well understood in molluscs as it is in insects, for example. These mechanisms have also been studied in crustaceans [15]. In crustaceans, the activation of the melanisation cascade could result from the entry of non-self molecules into the organism but also from tissue damage caused mechanically and/or biochemically by enzymes released by pathogens [19]. In crustaceans, these different non-self molecules are recognized by Pattern Recognition Proteins (PRP) on the surface of granulocytes and trigger the release of proPPA from the hemocytes. This zymogen, which belongs to the proPO activating system (proPO-AS), is then activated by a protease cascade and becomes ppA, which is the enzyme able to activate the proPO into activated PO by proteolytic cleavage. The complexity of the PO-activating cascade means that it has a number of different regulatory mechanisms, which makes it interesting to biochemically characterize this enzyme, its activators and its inhibitors in order to better understand its action mechanisms [14,20].

There is some confusion about the term “phenoloxidases”. All phenoloxidases are copper-containing proteins that can act on two types of substrates: monohydroxyphenols and dihydroxyphenols. More precisely, the term phenoloxidases includes tyrosinases (E.C. 1.14.18.1), which oxidize monophenols into *o*-diphenols; catecholases (E.C. 1.10.3.1), which oxidize *o*-diphenols into *o*-quinones; and laccases (E.C. 1.10.3.2), which oxidize *o*-diphenols into *o*-quinones and *p*-diphenols into *p*-quinones. Even though knowledge about mollusc phenoloxidases is not as precise as for PO in crustaceans or insects, their implication in the immune system has already been studied. In fact, POs not only have a role in melanisation but also in self/non-self recognition, phagocytosis and nodule formation [21–25] making them key enzymes of the immune system.

The present paper reports the biochemical characterization of the PO activity in the acellular fraction of the hemolymph of the clam *V. philippinarum* using various specific substrates and inhibitors specific to one or more PO subclass and the determination of the optimal temperature, the inactivation temperature and the optimal pH of *V. philippinarum*'s POs.

2. Materials and methods

2.1. Live material

Around 400 adult *V. philippinarum*, 42.79 ± 2.23 mm long from the hinge to the frontal edge of shell, were collected in Ile Tudy, South Finistère, by SATMAR (Aquaculture Company) on August 29, 2011 and transferred to the laboratory. These clams were maintained in aerated aquaria (300 L) at room temperature (16 °C) and acclimated for 2 days before experiments were carried out. This acclimatization was relatively short given the fact that no challenge

was expected but simply collection of hemolymph on each individual before sacrificing them.

2.2. Preparation of hemolymph samples

Just before sampling, animals were removed from their aquaria. Hemolymph of the 400 clams was collected from the posterior adductor muscle, through the hinge using a needle (25G 0.5 × 16 mm) fitted onto a 1 mL sterile syringe. The hemolymph collected from all clams was pooled and centrifuged at 785 g for 5 min, at 4 °C, to separate the cellular fraction (hemocytes) from the acellular fraction of the hemolymph. The resulting supernatant (i.e., acellular fraction of the hemolymph), also referred to as HL (hemolymph), was stored at –80 °C until use in the assays. No activators were used because the PO in the hemolymph supernatant was activated by freezing at –80 °C and then thawing. Indeed, in some assays that were done after freezing at –80 °C, the PO activity was the same in the presence or absence of sodium dodecyl sulfate 0.1% (data not shown), which is commonly used as a PO activator [26–28]. These results suggest that freezing at –80 °C activates all proPO present in the acellular fraction of the hemolymph into active PO.

2.3. Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (France) except for BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, which was obtained from BioRad France.

2.4. Protein determination

The total protein content of *V. philippinarum* acellular fraction of the hemolymph was determined by the Bradford method [29] using BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad France) and bovine serum albumin (BSA) as the protein standard.

2.5. Phenoloxidase activity assays

PO activity was higher in the acellular fraction of the hemolymph than in the cellular fraction, which is why PO activity was first analysed in this fraction. PO activity was assayed spectrophotometrically in 96-well microplates (Greiner 96-F-bottom), by recording the formation of quinones according to the protocol of Ford and Paillard [30], with some modifications.

Briefly, 50 µL Tris–HCl buffer (0.10 M, pH 8.0) were added to 50 µL of HL, and this mixture was incubated for 10 min at 25 °C. Then, 100 µL substrate, prepared at several concentrations, were added to each well. The plate was quickly mixed and placed in a microplate spectrophotometer (POLARstar OMEGA – BMG Labtech) to measure absorbance (A) at 25 °C immediately after the substrates were added. PO activity was then monitored for 45 min following the increase of absorbance at the substrate-specific wavelength. At the same time, the spontaneous oxidation of each substrate was measured by replacing HL with pure water in blank runs, and the values thus obtained were subtracted from test values. Buffer controls (containing 50 µL HL, 50 µL pure water and 100 µL substrate) and substrate controls (containing 50 µL HL, 50 µL Tris–HCl buffer and 100 µL pure water) were also used. For each treatment, controls, samples and blanks were tested in triplicate. PO activity was estimated based on the increment in the rate of absorbance (A) per minute obtained from the slope of the linear region from the plot of absorbance on time. The PO specific activities were expressed in arbitrary Unit (U) per milligram of total protein. One U is defined as the quantity of enzyme that, in optimum conditions of pH, temperature and substrate saturation,

produces 1 μmol of product per minute [31,32] and was obtained as follows:

$$\text{PO specific activity} = (\Delta A \cdot \text{min} - 1 \times \text{dilution factor}) / \text{Total protein concentration}$$

2.5.1. Substrates

A number of different potential substrates were tested. These substrates could be tyrosinase-specific (monophenols), laccase-specific (metoxyphenols, p-diphenols and non-phenolic substrates) or o-diphenols, which either can or cannot be oxidized directly by each PO subclass.

L-DOPA, dopamine, 3,4-dihydroxyphenyl propionic acid (DHPPA) and 1,2-dihydroxybenzene (catechol) were used as substrates common to all three PO subclasses. 4-hydroxyanisole (4-HA), L-tyrosine and p-hydroxyphenyl propionic acid (PHPPA) were used as a tyrosinase-specific substrates. P-phenylenediamine (PPD), O-phenylenediamine (OPD), 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine (syringaldazine), 2,2'-bis diammonium salt (ABTS) and 1,4-benzenediol (hydroquinone) were used as laccase-specific substrates.

Substrate solutions were prepared in pure water just before use except for syringaldazine, PPD and OPD, which were prepared in methanol.

Each time it was possible, the Michaelis–Menten constant (K_m) and the maximum reaction velocity (V_m) were obtained from the Lineweaver–Burk equation, a linear transformation of the Michaelis equation. An Eadie–Hofstee plot was also made to calculate the inhibition constant K_i when there was substrate inhibition.

2.5.2. Phenoloxidase inhibition assay

2.5.2.1. Consequences of dose–response inhibitors on phenoloxidase activity. A PO inhibition assay was performed by preincubating 50 μL PO inhibitor (prepared at various concentrations) in Tris–HCl buffer with 50 μL HL, for 10 min at 25 °C. A PO assay was then carried out with 100 μL L-DOPA (0.04 M) dissolved in pure water.

2-Hydroxy-2,4,6-cycloheptatrien-1-one (tropolone), kojic acid, benzoic acid, 2-propanol, citric acid, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 4-hydroxybenzhydrazide (HBHZ), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), thiourea and N-phenylthiourea (PTU) were tested as potential common PO inhibitors. 4-Hexylresorcinol (4-Hr) and salicylhydroxamic acid (SHAM) were tested as potential tyrosinase- and catecholase-specific inhibitors. Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) was tested as a potential laccase inhibitor.

Dose-response curves were plotted and calculations were performed to identify the concentration corresponding to the

maximum of inhibition and the concentration causing 50 per cent inhibition (IC_{50}).

2.5.2.2. Types of inhibitions. For a given inhibitor concentration, PO activity was measured in the presence of increasing L-DOPA concentration ranging from 5 to 20 mM in order to define the type of inhibition and to calculate K_i values. For these assays, inhibitor concentrations were equal or close to the IC_{50} values. The K_m and V_{max} values, obtained in presence of the inhibitor (i.e., $K_{m \text{ app}}$ and $V_{\text{max app}}$), were compared to the values obtained without any inhibitor to establish whether if the inhibitor acted as a competitive, a non-competitive or a mixed inhibitor. For an inhibitor acting as a competitive inhibitor, the K_i value was calculated as:

$$K_i = \frac{K_m \times [I]}{K_{m \text{ app}} - K_m}$$

where $[I]$ is the tested inhibitor concentration and $K_{m \text{ app}}$ is the K_m value in presence of the inhibitor.

For an inhibitor acting as a non-competitive inhibitor the K_i value was calculated as:

$$K_i = \frac{[I] \times V_{\text{max app}}}{V_{\text{max}} - V_{\text{max app}}}$$

where $V_{\text{max app}}$ is the V_{max} value in presence of the inhibitor.

2.6. Optimum temperature and thermostability

To determine optimal temperature of *V. philippinarum* PO, a reaction mixture containing 50 μL hemolymph, 50 μL Tris–HCl buffer (0.10 M; pH 8.0) and 100 μL L-DOPA (0.04 M) was incubated at different temperatures from 3 to 73 °C. PO specific activities were expressed in U per milligram total protein.

To estimate PO thermostability, hemolymph was preincubated, for 30 min, at different temperatures from 2.8 to 60 °C. The tubes were then put into iced water, the reaction mixtures prepared and the PO activities measured under the same conditions as described in section 2.4.

2.7. Optimum pH

To assay the influence of pH on PO activity, 50 μL hemolymph were added to 50 μL TrisHCl 0.1 M buffer at pH values 7.65–9.15. These mixtures were incubated for 10 min at 25 °C before adding 100 μL L-DOPA (0.04 M) and measuring PO specific activity as described in section 2.4 in U per mg total protein.

Table 1

Tested substrates with their corresponding wavelengths and kinetic constants. L-DOPA: 3,4-dihydroxy-L-Phenylalanine; DHPPA: 3-(2,4-dihydroxyphenyl) propionic acid; 4-HA: 4-methoxyphenol; PHPPA: 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid; PPD: P-phenylenediamine; O-phenylenediamine; ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt. Ø: non-determined.

Substrate specificity	Type of substrate	Substrate	Range of final substrate concentrations tested (mM)	Wavelengths (nm)	K_m (mM)	V_{max} (U/mg protein)
Non-specific	O-diphenol	L-DOPA	30 to 0.0025	492	3.75	12.63
		Dopamine	50 to 0.5	492	4.91	10.55
		DHPPA	80 to 0.25	400	Ø	Ø
		Catechol	30 to 0.001	405	1.97	1.72
Tyrosinase	Monophenol	4-HA	30 to 0.5	492	Ø	Ø
		Tyrosine	30 to 0.01	492	Ø	Ø
		PHPPA	100 to 0.5	492	47.33	0.72
Laccase	Non-phenolic	PPD	50 to 0.5	420	14.46	0.23
		OPD	80 to 0.5	420	16.98	0.92
	Methoxyphenol	Syringaldazine	10 to 0.005	525	Ø	Ø
		ABTS	13.7 to 0.05	420	Ø	Ø
	P-diphenol	Hydroquinone	200 to 0.25	390	4.17	3.09

2.8. Statistical analysis

All values are given as means \pm standard deviation (SD) and all statistical analyses were done using STATGRAPHICS Plus 5.1.

3. Results

3.1. Protein assay

The average value of the total protein concentration was $0.345 \pm 0.016 \text{ mg.mL}^{-1}$.

3.2. Phenoloxidase assays

For all substrates and inhibitors tested, enzymatic oxidation results were systematically corrected by the non-enzymatic auto-oxidation.

3.2.1. Phenoloxidase activity assays on different substrates

For non-specific PO substrates, no activity was detected using DHPPA as substrate. Conversely, PO-like activity was detected in the presence of L-DOPA ($K_m = 3.75 \text{ mM}$), or catechol ($K_m = 1.97 \text{ mM}$) (Table 1). For the substrate dopamine, a decrease of PO activity was observed for substrate concentrations above 15 mM (Fig. 1). For this latter substrate, the K_m value calculated for concentrations ranging from 0 to 15 mM was 4.91 mM. For dopamine concentrations higher than 15 mM, the substrate inhibition constant was calculated as 41.11 mM. V_m values were very dependent on the *o*-diphenols used, following the sequence: L-DOPA > dopamine > catechol (12.63, 10.55 and $1.72 \Delta A \text{ min}^{-1}/\text{mg protein}$, respectively). K_m did not follow the same ranking as the highest affinity was observed for catechol ($K_m = 1.97 \text{ mM}$), but this was associated with the lowest V_m .

When tyrosinase-specific substrates were used, no activity was detected either with 4-HA or tyrosine. The K_m value of PO for PHPPA calculated as 47.33 mM was thus higher than for the common substrates (Table 1).

Finally, PPD, OPD, hydroquinone (Fig. 1), syringaldazine and ABTS, which are laccase-specific substrates, were tested. No activity was detected using metoxiphenol substrates (i.e., syringaldazine and ABTS), whereas K_m value was calculated as 4.17 mM for the *p*-diphenol hydroquinone and as 14.46 and 16.98 mM for the aromatic amines PPD and OPD, respectively (Table 1).

3.2.2. Effects of different phenoloxidase inhibitors

The next step in the characterization of PO-like activity in acellular fraction of the hemolymph from the clam *V. philippinarum* consisted in studying the effect of various inhibitors. L-DOPA was used as substrate, as this is a common substrate for the three PO subclasses. Inhibitors specific to tyrosinase, laccase and catecholase activities were tested and concentrations responsible for maximum inhibition (i.e., the point at which enzyme activity stops growing and reaches a plateau as inhibitor concentration increases) and IC_{50} were calculated for each. Again, enzymatic oxidation results were systematically corrected from non-enzymatic auto-oxidation. Results are summarized in Table 2. PO activity was totally inhibited by 2.5 mM EDTA, 5 mM kojic acid, 2.5 mM citric acid, 3.12 mM PMSF, 5 mM benzoic acid and 5 mM tropolone. The PO activity was extremely sensitive to EDTA, kojic acid and citric acid, with IC_{50} values ranging from 0.44 to 0.57 mM. PO activity was also greatly inhibited by 3.27 mM isopropanol, 100 mM thiourea and 10 mM PTU (95%, 70% and 65% respectively). The inhibitor HBHZ exerted a maximal inhibition of 45% for a concentration equal to 3.16 mM, so the IC_{50} values could not be calculated. The catecholase- and tyrosinase-specific inhibitors, SHAM and 4-Hr, strongly inhibited the enzymatic

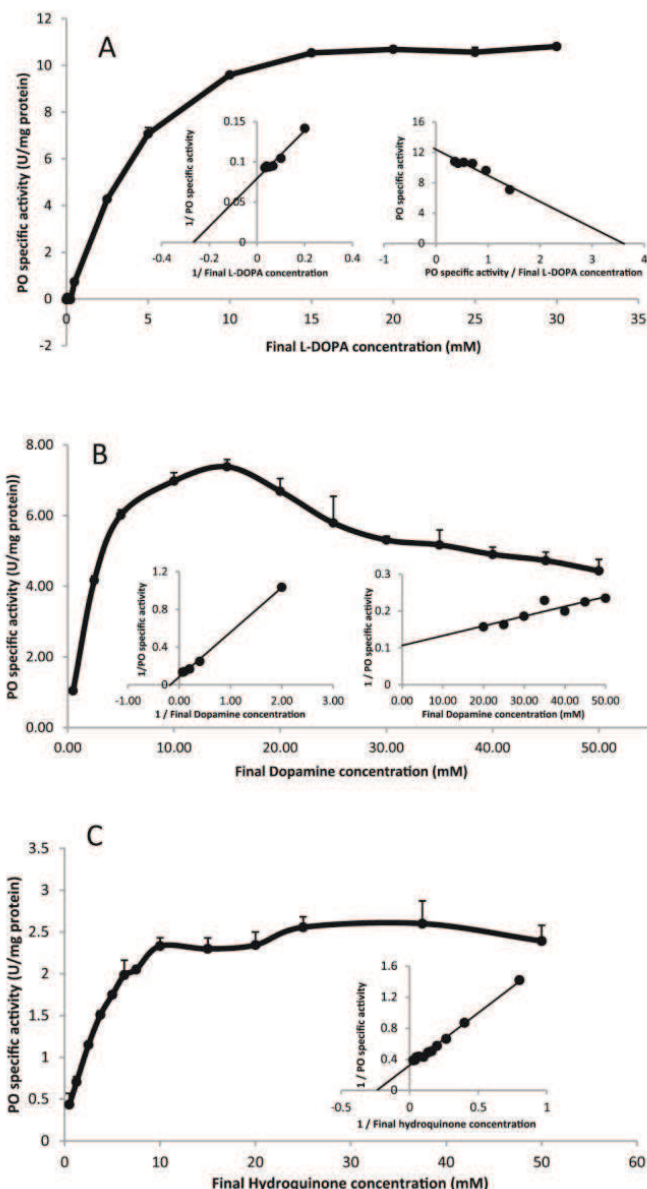


Fig. 1. Kinetic properties of *Venerupis philippinarum* PO. (A) L-DOPA; inside curves are a Lineweaver–Burk plot (left) and an Eadie–Hofstee plot (right). (B) Dopamine; inside curves are a Lineweaver–Burk plot for dopamine concentration ranging from 0.5 to 15 mM (left) and plot of 1/PO specific activity according to final substrate concentration for dopamine concentration ranging from 20 to 50 mM. (C) Hydroquinone; inside curve is a Lineweaver–Burk plot.


oxidation of L-DOPA (100% for 7.5 mM and 70% for 2.5 mM respectively) with very low IC_{50} (0.28 mM and 0.25 mM, respectively). The laccase-specific inhibitor, 2.5 mM CTAB exerted 90% inhibition.

3.2.3. Type of inhibition

To determine inhibitor mode of action, the PO activity was measured using L-DOPA at concentrations ranging from 5 to 20 mM in the presence of the inhibitors at concentration equal or close to the IC_{50} value. In this study, among the different inhibitors tested 4-Hr, kojic acid, tropolone, SHAM, PTU, isopropanol and PMSF acted as competitive inhibitors, whereas HBHZ acted as a non-competitive one. The mode of action of citric acid, benzoic acid, EDTA and thiourea was defined as mixed inhibition one in this study. The results obtained are summarized in Table 3.

Table 2

Inhibition constants for the different inhibitors tested. Concentrations shown are those which inhibition is maximal. IC 50 corresponds to the concentration for which the inhibition is equal to 50%.

Specificity	Inhibitors	Concentration (mM)	Maximum inhibition (%)	IC50 (mM)	
Non-specific	EDTA	2.5	100	0.44	USING L-DOPA
	Kojic acid	5	100	0.50	
	Citric acid	2.5	100	0.57	
	PMSF	3.125	100	1.11	
	Benzoic acid	5	100	1.45	
	Tropolone	5	100	1.46	
	Isopropanol	3.27	95	1.95	
	PTU	10	65	4.90	
	Thiourea	100	70	31.80	
	HBHZ	3.16	45		
Catecholase and tyrosinase	SHAM	7.5	100	0.28	Using hydroquinone
	4-Hr	2.5	70	0.25	
Laccase	CTAB	2.5	90	0.67	
Catecholase and tyrosinase	SHAM	10	84	3.39	

3.3. Optimal temperature, pH and thermal inactivation

3.3.1. Optimal temperature and pH

Before studying the effect of pH on *V. philippinarum* PO activity, the pH value of the acellular fraction of the hemolymph used was determined and found to be 7.69. The effect of pH on clam PO activity was studied over the pH range 7.65–9.15 using Tris–HCl buffer and 0.04 M L-DOPA as substrate. Under these conditions, PO exhibited maximum activity at pH 8.4 (Fig. 2A).

To determine the optimum temperature of PO activity, enzymatic activity was determined at different temperatures from 3 to 73 °C, using L-DOPA as substrate. Under these conditions, the optimal temperature of PO activity was around 40 °C (Fig. 2B).

3.3.2. PO denaturation temperature

To determine the denaturation temperature of the enzyme, the acellular fraction of the hemolymph was incubated at different temperatures from 2.8 to 60 °C before doing the PO activity assays. *V. philippinarum* PO was denatured for temperature above 50 °C (Fig. 3). At 60 °C, the PO activity was equal to 56% of the maximum activity.

4. Discussion

V. philippinarum, one of the main cultured shellfish species in the world, is subjected to brown ring disease (BRD) along the coasts of Europe. Since 1987, the infection of this clam by *V. tapetis* has led to high mortality levels and corresponding economic losses [6,71].

To counter these mortalities, it is important to understand the mechanisms of action of the pathogenic bacteria, but also to understand the operation of the host immune system. In the bivalve immune system, humoral factors, especially circulating enzymes and anti-microbial peptides, play an important role because of their anti-microbial properties [72]. A recent study underlined the fact that nitric oxide synthase activity is higher in *V. philippinarum* after contact with *V. tapetis* than after contact with non-pathogenic bacteria: hemocytes produced nitric oxide when in contact with the pathogen and this production was dose-dependent [73].

Other studies highlight the role of phenoloxidases in different species faced with diseases or contaminations. For instance Peters and Raftos [74] found a negative correlation between phenoloxidase activity in the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* and the progress of the QX disease. Another study dealt with the infestation of *V. decussata* by *Perkinsus atlanticus*, showing that infestation significantly increased the PO activity in the hemolymph compared with non-infected animals [21]. PO activity was also detected at the 6-h embryo stage of Pacific oysters *C. gigas* [43], and the authors hypothesized that PO detected on the outer surface of embryos may be of maternal origin and represent a preventive strategy to ensure optimal larval development. In adult individuals, the antibacterial activity of laccase-type enzyme was proven and a *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus* growth inhibition was observed [24]. It was also in this species, *C. gigas*, that was made the first molecular characterization of a laccase-like gene in a marine bivalve and especially in individuals challenged with Ostreid herpesvirus 1 [25].

Table 3

Mode of action of the different inhibitors tested. K_i is the inhibition constant calculated for an inhibitor at a concentration equal to the IC50 value.

		K_m (mM)	V_{max} (U.I./mg)	K_i (mM)	Competitive inhibitor	Non-competitive inhibitor	Metal chelator	Mixed inhibitor	References discussing the type of inhibition
Inhibitors	No inhibitor	3.75	0.028						
	Kojic acid	24.28	0.031	0.334	×				[33,34]
	Tropolone	9.38	0.029	0.974	×		×		[35–44]
	4-HR	24.32	0.024	0.046	×				[35,38,45–48]
	SHAM	11.98	0.025	0.128	×		×		[35,38,49]
	Citric acid	12.87	0.020					×	[47,50]
	Benzoic acid	22.45	0.004					×	[51–54]
	Isopropanol	7.94	0.026	1.116	×				
	PMSF	12.43	0.029	0.480	×				[41,55,56]
	EDTA	9.46	0.009				×	×	[28,57,58]
	Thiourea	13.60	0.007				×	×	[59–62]
	Phenylthiourea	43.10	0.025	0.467	×		×		[38,39,57,63–69]
	HBHZ	5.95	0.015	0.135		×			[57,70]

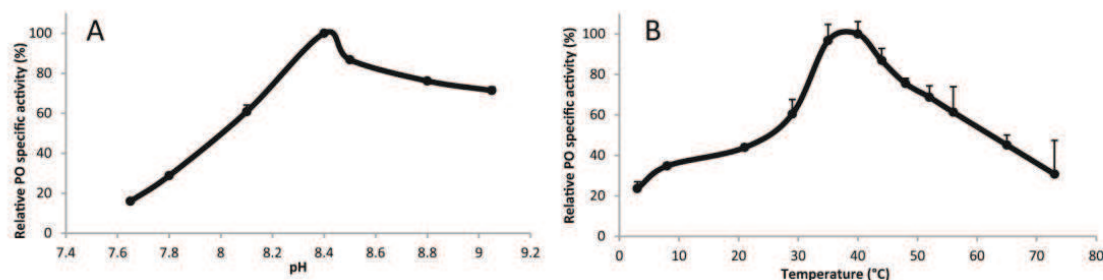


Fig. 2. (A) Effect of pH on *Venerupis philippinarum* PO. The optimal pH was 8.4. (B) Effect of temperature on *V. philippinarum* PO activity. The optimum temperature was around 40 °C. PO specific activity values are the means of assays \pm S.D.

The enzyme tyrosinase or phenoloxidase catalyses the hydroxylation of monophenols (monophenolase activity) and the oxidation of *o*-diphenols to *o*-quinones (diphenolase activity). These *o*-quinones evolve non-enzymatically to yield several unstable intermediates that polymerize to give melanins [32]. In the Manila clam, using L-DOPA, a common substrate for the three PO subclasses, the highest phenoloxidase activity was localized into the acellular fraction of the hemolymph [75]; therefore, we chose to perform phenoloxidase assays on this compartment in the present study. Different substrates were tested and the most effective was found to be 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA). This substrate is the most commonly used [39,76–79] and exhibited the highest activity. Nevertheless, it cannot be used to discriminate between the three phenoloxidase subclasses as it is an *o*-diphenol, which could be oxidized by tyrosinases, laccases and catecholases. Other *o*-diphenols, like dopamine or catechol, could be used to detect PO activity in *V. philippinarum*. The acellular fraction of the hemolymph extract showed a higher affinity for catechol, with the lowest apparent K_m value (1.97 mM), compared to L-DOPA and dopamine with apparent K_m equal to 3.75 and 4.91 mM, respectively. This means that PO has a better affinity for catechol, but its apparent V_m value was lower than both the other *o*-diphenol substrates used. Moreover we noted that dopamine leads to an inhibition by the substrate. In fact, for dopamine concentrations higher than 15 mM we can see a decrease in the PO specific activity. For another *o*-diphenol, DHPPA, no PO activity was detected in the clam acellular fraction of the hemolymph. These results are similar to the findings of Luna-Acosta and collaborators who studied the PO activity in *C. gigas* and found no PO activity using DHPPA, but the K_m value for oyster PO using L-DOPA was more than seven times lower important than for dopamine: 7 and 51 mM, respectively [38].

In contrast to *o*-diphenols, monophenols allow the differentiation of tyrosinases and other phenoloxidases because the cresolase activity, which permits the oxidation of monophenols into

o-diphenols, is a specific tyrosinase activity. In this study, no activity was detected with either 4-HA or tyrosine as substrates, but activity was detected using PHPPA even though the K_m value for the enzyme was around thirteen times higher for PHPPA than for L-DOPA. The maximum of activity with this substrate is also lower important than for other substrates. These results differed from those obtained by Cong et al. [28], who found a cresolase activity in purified PO using tyrosine as substrate. A cresolase activity was also found using tyrosine in the hemolymph of the crab *Charybdis japonica* [58], but no activity was detected in the hemolymph of *C. gigas* [38].

To detect laccase activity, it is possible to use *p*-diphenols or methoxyphenols as substrates [80]. There have been few studies on the use of methoxyphenols, which are laccase-specific substrates. Here we examined two different methoxyphenols: syringaldazine and ABTS. No activity was detected using these substrates, but it must be noted that syringaldazine was particularly difficult to dissolve in either water or methanol. Luna-Acosta et al. [38] also used ABTS to detect laccase activity in *C. gigas* acellular fraction of the hemolymph but detected no activity. However, laccase activity was detected using ABTS with laccase from *Trametes versicolor* [65]. Another laccase-specific substrate that has been used is the *p*-diphenol hydroquinone. *V. philippinarum* PO had a high affinity for hydroquinone, as the K_m value was equal to 4.17 mM, but the maximum activity was not as high as for L-DOPA or for dopamine. Laccase activity was also detected in hemocyte lysate supernatant of *Chlamys farreri*: the enzymatic activity was higher using hydroquinone than the common PO substrate L-DOPA [23]. Hydroquinone was also used to detect laccase activity in the hemolymph of Sydney rock oyster *S. glomerata* [81]. It is also possible to use aromatic amines such as PPD or OPD for this purpose. These substrates were oxidized and, even though the affinity of the enzyme for these substrates was low (K_m value equal to 14.46 and 16.98, respectively), the PO specific activities were significant. OPD had never been tested in previous studies, but PPD had also been found to be oxidized by the PO of the hemolymph of *C. gigas* [38]. A bacterial growth inhibition, attributable to a laccase-type enzyme in *C. gigas*, was observed in presence of PPD and this one was higher than with the common substrate L-DOPA [24].

The results obtained with the different substrates emphasize the fact that acellular fraction of the hemolymph of *V. philippinarum* mainly has laccase activity, although it seems that there is also tyrosinase activity because PO activity is detected using a single tyrosinase-specific substrate (PHPPA). These results are quite different from the results obtained by Cong et al. [28], as these previous authors concluded that *V. philippinarum* only had tyrosinase activity.

In order to confirm the presence of both laccase and tyrosinase activities, and to differentiate between their two activities, we used specific inhibitors that affect either laccase or tyrosinase activity. 4-Hr and SHAM are mentioned in the literature as specific

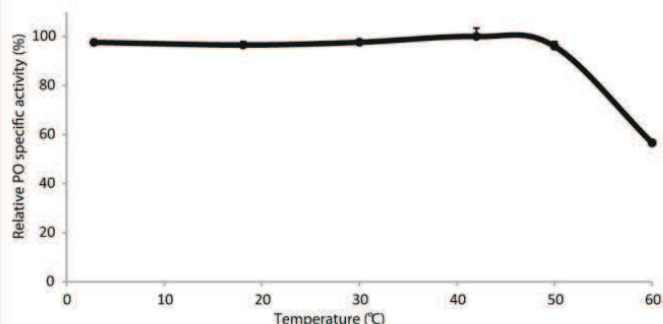


Fig. 3. Effect of temperature on *Venerupis philippinarum* PO denaturation. *V. philippinarum* PO was denatured for temperatures up to 50 °C. PO specific activity values are the means of triplicate assays \pm S.D.

inhibitors of both catecholases and tyrosinases [35,38]. These two inhibitors had the lowest IC₅₀ values of all inhibitors tested (0.25 mM and 0.28 mM, respectively). Nevertheless, 4-Hr failed to fully inhibit PO activity (maximum of inhibition reached 70%). For SHAM, the inhibition was total for a solution concentration equal or superior to 7.5 mM, which is not consistent with the results obtained using different substrates. Indeed, if inhibition is total using a tyrosinase- and catecholase- specific inhibitor, the majority enzyme could not be a laccase. Complementary assays were done using hydroquinone, which is a laccase-specific substrate with which only the laccase activity could be measured. SHAM, theoretically could not have any effect on the oxidation of hydroquinone because it does not inhibit laccase activity. However, SHAM greatly inhibited the PO activity measured using the laccase-specific substrate hydroquinone, leading to more than 80% inhibition of PO activity for 10 mM SHAM (data not shown). As SHAM greatly inhibited the enzymatic oxidation of hydroquinone it could not be tyrosinase and catecholase specific so the inhibition observed with SHAM was not inconsistent with the fact that the main PO activity in the acellular fraction of *V. philippinarum* is laccase. A laccase-specific inhibitor, CTAB, was also used, with which PO activity inhibition was very high, but not total (90%). This result confirms the fact that the majority PO subclass present in the acellular fraction of the hemolymph of *V. philippinarum* is laccase, but that is not the only one.

Different potential inhibitors of phenoloxidases were used in this study, but few were specific to one or more PO subclasses. A strength of our study is that for each inhibitor a dose-effect was applied, which enabled us to define the maximum inhibition for each inhibitor as well as the inhibitor concentration necessary to reach an inhibition of the PO activity of 50%. Other potential inhibitors were tested even if they are not specific to one or two PO subclasses. EDTA, kojic acid, citric acid, PMSF, benzoic acid and tropolone all led to total PO inhibition, even though the IC₅₀ values varied from 0.44 to 1.46 mM. Cong et al. found 98% PO activity inhibition using benzoic acid at the same inhibitor concentration [28], but results for citric acid are a little different. In this study, the inhibition was equal to 100% with 2.5 mM citric acid solution whereas Cong et al. found 76% PO activity inhibition using a 5 mM citric acid solution [28]. This difference could be partially explained by the fact that the present study used total supernatant hemolymph whereas Cong et al. used PO purified from heart hemolymph. Some inhibitors such as EDTA (a specific chelating agent for divalent cations), Tropolone, PTU or SHAM are copper chelators. Their inhibitory effects imply that the PO of *V. philippinarum* has the properties of a metalloenzyme and, most probably, a kind of copper-containing metalloenzyme. These characteristics make it similar to the PO from many other marine invertebrates, such as crab *C. japonica* [61], shrimp *Penaeus chinensis* [82], or oysters *C. gigas* [38] and *S. glomerata* [18,57].

Results on the type of inhibition are quite different here, from those found in the literature. For instance, the literature describes citric acid and EDTA as chelating agents that destabilize the active site of the enzyme [50,57], so they would be expected to cause competitive inhibition. In our study, however, the inhibitions using L-DOPA as substrate seemed to be mixed. In fact, the K_m values were increased for both citric acid and EDTA and the V_{max} values were decreased in their presence. Benzoic acid has also been described as a competitive inhibitor of grape and palm phenoloxidases, using 4-methylcatechol as substrate [53,54]. Our results suggest that benzoic acid exercised a mixed type of inhibition on *V. philippinarum* PO activity when L-DOPA was used as a substrate. An explanation of these results could be that there is both laccase and tyrosinase activity. An inhibitor could have two different modes of action on two quite similar enzymes, as described for the *Fungus Agaricus*

bisporus tyrosinases where benzoic acid exhibited uncompetitive inhibition for the α and β -tyrosinases but exhibited competitive inhibition for γ -tyrosinase. Other inhibitors are known to act as chelating agents of the copper ions of the active site, including kojic acid [33,34], tropolone [37,44] and SHAM [38,49]. For these inhibitors, our results are in agreement with the literature and lead to the conclusion that they act by competitive inhibition. The results obtained in our study using 4-Hr are in agreement with those obtained by Luna-Acosta et al. [38], who described 4-Hr as a competitive inhibitor for oyster PO. In 2007, Cheriot also defined 4-Hr as a competitive inhibitor for potato PO, using 4-methylcatechol as substrate [48]. Other compounds could bind to the catalytic site of the enzyme because they contain sulfur which forms copper sulfide with the copper present in the enzyme and thus blocks the active site [83]. This is the case for PTU, which acts as a competitive inhibitor on *V. philippinarum* PO activity when L-DOPA is used as substrate. For thiourea, which also includes sulfur, our results suggest that there is a mixed inhibition. This could be explained by a hypothesis proposed by Brack et al. [69] for tyrosinase in which there could be two binding sites: a first site, which is the active one and a second binding site with more or less affinity for the inhibitor compound. In our study, we could also hypothesize that there is a second binding site with a higher affinity for thiourea than for PTU. Hence, the inhibition of PO activity by PTU would be a competitive one, whereas the inhibition by thiourea would be mixed. Among the inhibitors tested, only HBHZ, which is a dopa-decarboxylase inhibitor [57,70], exhibited a non-competitive type of inhibition.

The optimal pH of *V. philippinarum* PO was about 8.4 with L-DOPA as substrate. This result is not in accordance with the optimum pH of 7 found by Cong et al. [28] for purified clam PO. This difference could be explained by a genetic difference between populations and/or different native environmental conditions that may account for the different optimum pH levels, since this characteristic depends to a large extent on the physiological conditions in which animals are maintained. It also may be noted that, even though they were always subtracted from the enzymatic oxidation of substrate values, the auto-oxidation values of the substrate dramatically increased with the pH.

The optimal pH of *V. philippinarum* PO was inferior to the optimal pH of PO from the amphioxus cephalocordate *Branchiostoma belcheri tsingtauense* (pH 9) [84]. For Sydney rock oysters (*S. glomerata*), maximum PO activity occurred at pH 8 and decreased substantially at pH 9 [57]. Nevertheless, for other marine invertebrates, the optimal pH was often lower to 8 and equal to 7.5 for *Dugesia japonica* [63], *Penaeus setiferus* [85] and for *Botryllus schlosseri* [86]. For other species, like *C. japonica* [61] and *Penaeus chinensis* [82], the optimal pH was 6. A laccase-like enzyme in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) exhibited high activity at pH 4–5 with both DMP and ABTs as substrates [42].

Temperature is an important parameter to consider for the invertebrate immune system especially in the context of BRD for the Manila clam *V. philippinarum*. In fact it has been shown that temperatures up to 21 °C not only retarded the development of BRD, but enhanced the recovery process [71]. In our study, the optimal temperature for *V. philippinarum* PO was around 40 °C. This result is in agreement with the results of Cong et al. [28] who found an optimal temperature of 40 °C. This temperature is lower than that of *Biomphalaria belcheri tsingtauense* (55 °C) [84], but is in agreement with the temperature of other marine species like *C. farreri* (45 °C) [87], *P. setiferus* (45 °C) [85] and *Penaeus japonicus* (40 °C) [88]. For temperatures above 50 °C, *V. philippinarum* PO was denatured. This temperature is high given the fact that clams are ectothermal animals living in cold or temperate waters. More broadly, in the context of global change, it is also important to remember that environmental temperature is a major parameter in

marine bivalves because it significantly modulates cellular and humoral activities [89]. Hence, it could be interesting to study the effects of environmental temperatures on *V. philippinarum* PO specific activity.

This study allows us to conclude that PO activity in the Manila clam *V. philippinarum* is mainly a laccase-type activity. Nevertheless, there is also a non-negligible tyrosinase-type activity. Purification experiments are still in progress to confirm the presence of both POs and allow us to seek possible isoforms for each PO. Once these experiments are completed, we could study the activity of different PO isoforms as function of the progress of BRD in the Manila clam. Moreover, it would be interesting to compare the activity of possible PO isoforms between individuals of different sensitivity and/or resistance with regard to BRD.

Acknowledgements

This work was funded by University of Western Brittany. We would first like to thank the SATMAR company for providing the clams, especially Noël and Nicolas for their assistance in the field. We also thank Adeline Bidault-Toffin for her help for the samplings and Nelly Le Goïc for her technical assistance. We thank Helen McCombie-Boudry of the Bureau de Traduction Universitaire at UBO for her revision of the manuscript.

References

- Gosling E. Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Wiley; 2008 com.
- Caill-Milly N, Duclercq B, Morandau G. Campagne d'évaluation du stock de palourdes du bassin d'Arcachon-Année 2006; 2006.
- Organization FFAA. *Ruditapes philippinarum*. Cultured Aquatic Species Fact Sheets. Rome, Italy.
- Flassch J-P, Leborgne Y. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement. In: Introductions and transfers of aquatic species selected papers from a symposium held in Halifax, Nova Scotia, 12–13 June 1990 1992.
- Paillard C, Percelay L, Le Pennec M, Le Picard D. Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). Comptes rendus de l'Académie des sciences Série 3. Sciences de la vie 1989;309:235–41.
- Paillard C, Maes P. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. Comptes rendus de l'Académie des sciences Série 3. Sciences de la vie 1990;310:15–20.
- Paillard C, Maes P, Oubella R. Brown ring disease in clams. Ann Rev Fish Dis 1994;4:219–40.
- Paillard C, Maes P. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. J Invertebr Pathol 1995;65:91–100.
- Paillard C, Maes P. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: II. Microscopic study of the brown ring syndrome. J Invertebr Pathol 1995;65:101–10.
- Flye-Sainte-Marie J, Jean F, Paillard C, Kooijman SALM. A quantitative estimation of the energetic cost of brown ring disease in the Manila clam using dynamic energy budget theory. J Sea Res 2009;62:114–23.
- Goulletquer P. Mortalité hivernale chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* sur le littoral Atlantique: aspects biochimique et écophysique. Haliotis 1989;19:215–26.
- Plana S, Siquin G, Maes P, Paillard C, Le Pennec M. Variations in biochemical composition of juvenile *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio* sp. Dis Aquat Org 1996;24:205–13.
- Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. J Biochem Mol Biol 2005;38:128–50.
- Cerenius L, Kawabata S-i, Lee BL, Nonaka M, Söderhäll K. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. Trends Biochem Sci 2010;35:575–83.
- Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends Immunol 2008;29:263–71.
- Vavricka C, Christensen B, Li J. Melanization in living organisms: a perspective of species evolution. Protein Cell 2010;1:830–41.
- Rodríguez-López JN, Tudela J, Varón R, García-Carmona F, García-Cánovas F. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. J Biol Chem 1992;267:3801–10.
- Aladaileh S, Nair SV, Raftos DA. Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns. Fish Shellfish Immunol 2007;23: 1196–208.
- Galko MJ, Krasnow MA. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila larva*. PLoS Biol 2004;2:e239.
- Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD. Regulation of melanogenesis—controversies and new concepts. Exp Dermatol 2008;17:395–404.
- Muñoz P, Meseguer J, Esteban MÁ. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. Fish Shellfish Immunol 2006;20:12–9.
- Butt D, Raftos D. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. Dev Comp Immunol 2008;32:299–306.
- Xing J, Jiang J, Zhan W. Phenoloxidase in the scallop *Chlamys farreri*: purification and antibacterial activity of its reaction products generated in vitro. Fish Shellfish Immunol 2012;32:89–93.
- Luna-Acosta A, Saulnier D, Pommier M, Haffner P, De Decker S, Renault T, et al. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. Fish Shellfish Immunol 2011;31:795–800.
- Renault T, Faury N, Barbosa-Solomieu V, Moreau K. Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. Dev Comp Immunol 2011;35:725–35.
- Luna-González A, Maeda-Martínez AN, Vargas-Albores F, Ascencio-Valle F, Robles-Mungaray M. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol 2003;15:275–82.
- Perdomo-Morales R, Montero-Alejo V, Perera E, Pardo-Ruiz Z, Alonso-Jiménez E. Hemocyanin-derived phenoloxidase activity in the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804). Biochim Biophys Acta 2008;1780:652–8.
- Cong R, Sun W, Liu G, Fan T, Meng X, Yang L, et al. Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. Fish Shellfish Immunol 2005;18:61–70.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–54.
- Ford SE, Paillard C. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: Intra-individual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Fish Shellfish Immunol 2007;23:280–91.
- Fenoll LG, Rodríguez-López JN, Varón R, García-Ruiz PA, García-Cánovas F, Tudela J. Kinetic characterisation of the reaction mechanism of mushroom tyrosinase on tyramine/dopamine and L-tyrosine methyl ester/L-dopa methyl ester. Int J Biochem Cell Biol 2002;34:1594–607.
- Espín JC, Varón R, Fenoll LG, Gilabert M, García-Ruiz PA, Tudela J, et al. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. Eur J Biochem 2000;267:1270–9.
- Chen JS, Wei CI, Marshall MR. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. J Agric Food Chem 1991;39:1897–901.
- Chang T-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. Int J Mol Sci 2009;10: 2440–75.
- Dawley RM, Flurkey WH. Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexyl-resorcinol, a tyrosinase inhibitor. Phytochemistry 1993;33:281–4.
- Faure D, Bouillant M, Bally R. Comparative study of substrates and inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Piricularia oryzae* laccases. Appl Environ Microbiol 1995;61:1144–6.
- Kahn V, Andrawis A. Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. Photochemistry 1985;24:905–8.
- Luna-Acosta A, Rosenfeld E, Amari M, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immunol 2010;28:719–26.
- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. Fish Shellfish Immunol 2007;22:433–40.
- Dogan S, Turan Y, Ertürk H, Arslan O. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). J Agric Food Chem 2005;53:776–85.
- Ballarin L, Cima F, Sabbadin A. Phenoloxidase and cytotoxicity in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. Dev Comp Immunol 1998;22:479–92.
- Martínez-Álvarez O, Montero P, Gómez-Guillén C. Evidence of an active laccase-like enzyme in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). Food Chem 2008;108:624–32.
- Thomas-Guyon H, Gagnaire B, Bado-Nilles A, Bouilly K, Lapègue S, Renault T. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Dev Comp Immunol 2009;33:653–9.
- Zufelato MS, Lourenço AP, Simões ZL, Jorge JA, Bitondi MM. Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. Insect Biochem Mol Biol 2004;34:1257–68.
- McEvily AJ, Iyengar R, Otwell S. Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. Food Technol 1991;45:80–6.
- Montero P, Avalos A, Perez-Mateos M. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. Food Chem 2001;75:317–24.
- Montero P, Martínez-Álvarez O, Gómez-Guillén M. Effectiveness of onboard application of 4-Hexylresorcinol in inhibiting melanosis in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). J Food Sci 2004;69:C643–7.

- [48] Cheriot S. Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides. AgroparisTech; 2007.
- [49] Allan AC, Walker JR. The selective inhibition of catechol oxidases by salicylhydroxamic acid. *Phytochemistry* 1988;27:3075–6.
- [50] Yoruk R, Marshall MR. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J Food Biochem* 2003;27:361–422.
- [51] Jolivet S, Arpin N, Wichers HJ, Pellon G. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol Res* 1998;102:1459–83.
- [52] Menon S, Fleck RW, Yong G, Strothkamp KG. Benzoic acid inhibition of the α , β , and γ isozymes of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Arch Biochem Biophys* 1990;280:27–32.
- [53] Gunata YZ, Sapis J-C, Moutounet M. Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochemistry* 1987;26:1573–5.
- [54] Robert C, Rouch C, Cadet F. Inhibition of palmito (*Acanthopanax rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chemistry* 1997;59:355–60.
- [55] Robinson A, Edwards KJ, Carr PD, Barton JD, Ewart GD, Ollis DL. Structure of the C123S mutant of diene lactone hydrolase (DLH) bound with the PMS moiety of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000;56:1376–84.
- [56] Hata S, Azumi K, Yokosawa H. Ascidian phenoloxidase: its release from hemocytes, isolation, characterization and physiological roles. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1998;119:769–76.
- [57] Aladaileh S, Rodney P, Nair SV, Raftos DA. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007;148:470–80.
- [58] Fan T, Zhang Y, Yang L, Yang X, Jiang G, Yu M, et al. Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenoloxidase from the crab *Charybdis japonica*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2009;152:144–9.
- [59] Gopalakrishnan S, Thilagam H, Huang W-B, Wang K-J. Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* 2009;75:389–97.
- [60] Gollas-Galván T, Hernández-López J, Vargas-Albore F. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1999;122:77–82.
- [61] Liu G, Yang L, Fan T, Cong R, Tang Z, Sun W, et al. Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*. *Fish Shellfish Immunol* 2006;20:47–57.
- [62] Prabhakaran K, Harris E, Kirchheimer W. Effect of inhibitors on phenoloxidase of *Mycobacterium leprae*. *J Bacteriol* 1969;100:935–8.
- [63] Pang Q, Liu X, Zhao B, Jiang Y, Su F, Zhang X, et al. Detection and characterization of phenoloxidase in the freshwater planarian *Dugesia japonica*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2010;157:54–8.
- [64] Asokan R, Arumugam M, Mullainadhan P. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev Comp Immunol* 1997;21:1–12.
- [65] Hattori M, Konishi H, Tamura Y, Konno K, Sogawa K. Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *J Insect Physiol* 2005;51:1359–65.
- [66] Barrett F, Andersen S. Phenoloxidases in larval cuticle of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Insect Biochem* 1981;11:17–23.
- [67] Barrett FM. Phenoloxidases from larval cuticle of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*: characterization, developmental changes, and inhibition by anti-phenoloxidase antibodies. *Arch Insect Biochem Physiol* 1987;5:99–118.
- [68] Laskin J, Piccinini L. Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J Biol Chem* 1986;261:16626–35.
- [69] Brack A, Hellmann N, Decker H. Kinetic properties of hexameric tyrosinase from the crustacean *Palinurus elephas*. *Photochem Photobiol* 2008;84:692–9.
- [70] Vrecko K, Birkmayer J, Krainz J. Stimulation of dopamine biosynthesis in cultured PC 12 pheochromocytoma cells by the coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1993;5:147–56.
- [71] Paillard C, Allam B, Oubella R. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Org* 2004;59:249–62.
- [72] Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 1999;172:125–45.
- [73] Jeffroy F, Paillard C. Involvement of nitric oxide in the in vitro interaction between Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*. *Fish Shellfish Immunol* 2011;31:1137–41.
- [74] Peters R, Raftos DA. The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 2003;223:29–39.
- [75] Reid H, Soudant P, Lambert C, Paillard C, Birkbeck H. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Org* 2003;56:249–58.
- [76] Campello S, Beltrami M, Giordano G, Di Muro P, Marino SM, Bubacco L. Role of the tertiary structure in the diphenol oxidase activity of *Octopus vulgaris* hemocyanin. *Arch Biochem Biophys* 2008;471:159–67.
- [77] Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M. Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of Kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *J Food Biochem* 2005;29:470–85.
- [78] Liu H, Jiravanichpaisal P, Cerenius L, Lee BL, Söderhäll I, Söderhäll K. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 2007;282:33593–8.
- [79] Perdomo-Morales R, Montero-Alejo V, Perera E, Pardo-Ruiz Z, Alonso-Jiménez E. Phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;23:1187–95.
- [80] Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 1994;140:19–26.
- [81] Bezemer B, Butt D, Nell J, Adlard R, Raftos D. Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish Shellfish Immunol* 2006;20:627–36.
- [82] Fan T-J, Wang X-F. Purification and partial biochemical characterization of phenoloxidase from *Penaeus chinensis*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2002;34:589–94.
- [83] Gerdemann C, Eicken C, Krebs B. The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc Chem Res* 2002;35:183–91.
- [84] Zhang S, Li G. Presence of phenoloxidase and prophenoloxidase in the epidermal cells and the epidermis mucus of the lancelet *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *Ophelia* 2000;52:207–12.
- [85] Simpson BK, Marshall MR, Otwell WS. Phenol oxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties. *J Agric Food Chem* 1987;35:918–21.
- [86] Frizzo A, Guidolin L, Ballarin L, Sabbadin A. Purification and partial characterization of phenoloxidase from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Marine Biol* 1999;135:483–8.
- [87] Sun H, Li G. Phenoloxidase and myeloperoxidase activity in the haemocytes and serum of *Chlamys farreri*. *J Fishery Sci China* 1999;6:9–13.
- [88] Zhao J, Qi X, You Y, Wang J, Zhou P. Study on some characteristics of phenoloxidase from Japanese prawn, *Penaeus japonicus*. *J Shanghai Fisheries Univ* 1997;6:157–65.
- [89] Fisher WS. Environmental influence on host response. *Am Fish Soc Spec Publ* 1988;18:225–37.

3. Purification partielle de la phénoloxydase de *Venerupis philippinarum*

En parallèle des expérimentations de caractérisation biochimique de l'activité phénoloxydase dans le sérum de *Venerupis philippinarum*, la purification partielle de l'enzyme a été réalisée. Pour cela, différentes techniques de chromatographie, à basse pression, ont été utilisées ainsi que des techniques d'électrophorèse mono et bidimensionnelle.

3. 1. Chromatographie de filtration sur gel

Cette technique de chromatographie permet de séparer les molécules en fonction de leur taille. La séparation a été réalisée à 4°C sur une colonne de SEPHACRYL S-100 dont le domaine de fractionnement est compris entre 100 000 et 100 Da. Un échantillon de 0,8mL de sérum de palourde concentré 10,45 fois a été déposé sur la colonne de chromatographie. L'élution de l'échantillon a été réalisée à un débit de 0,61mL.min⁻¹ et le volume de chaque fraction collectée a été fixé à 1,5mL.

3. 1. 1. Etalonnage de la colonne de SEPHACRYL S-100

Le passage de quatre marqueurs de taille sur la colonne a permis d'obtenir une droite d'étalonnage et donc d'estimer la masse moléculaire de la protéine étudiée. La figure 32 présente la courbe d'étalonnage du logarithme de la masse moléculaire (Mw : Molecular Weight) en fonction du volume d'élution (en mL).

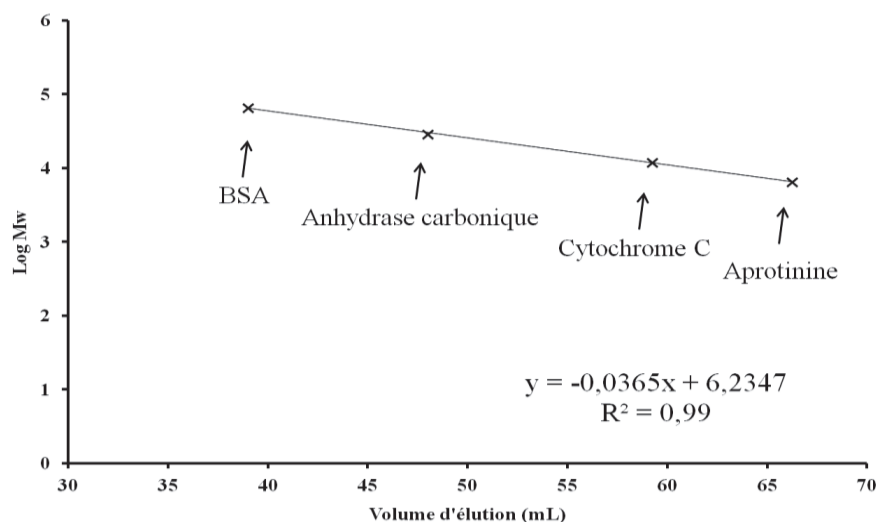


Figure 32. Courbe d'étalonnage de la colonne de chromatographie par exclusion de taille (Sephacryl S-100). BSA : Bovine Serum Albumin (albumine de sérum bovin) : 66KDa ; Anhydrase carbonique : 29KDa ; Cytochrome C : 12KDa ; Aprotinine : 6,5KDa.

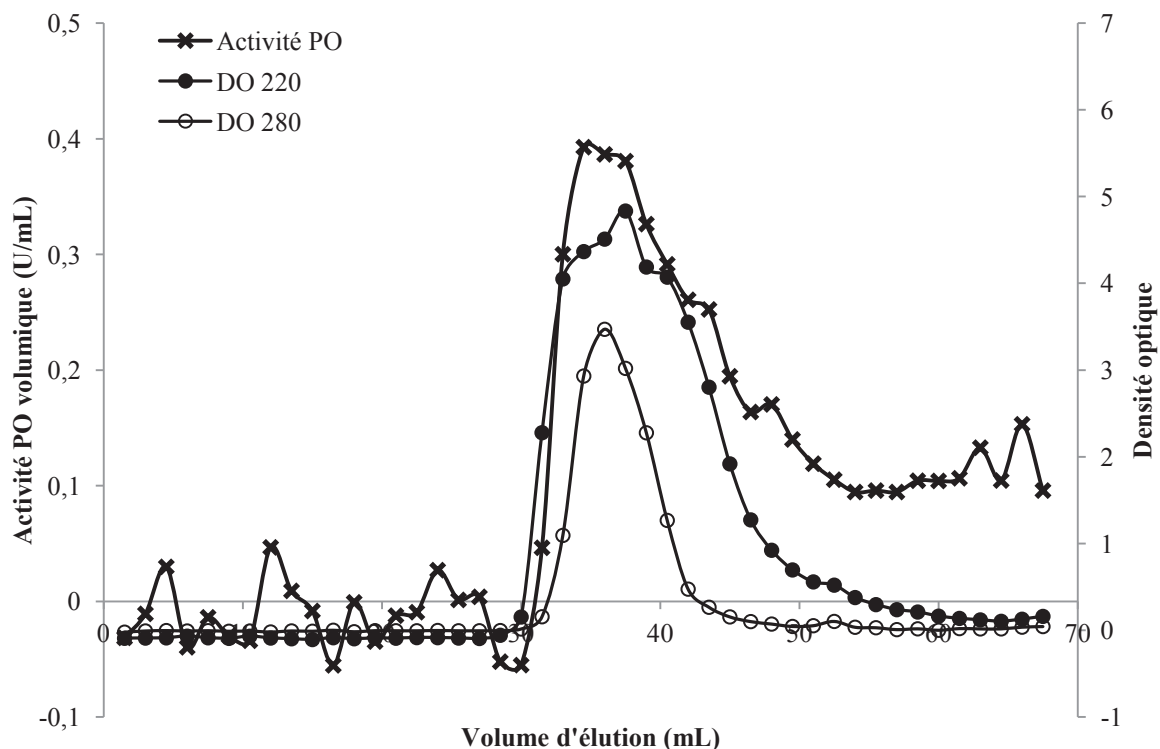


Figure 33. Chromatogramme obtenu après dépôt, sur une colonne de SEPHACRYL S-100 (colonne : L=235mm ; Ø=28mm), de 0,8mL de sérum d'hémolymph concentré 10,45 fois (teneur initiale en protéines totales du sérum avant concentration : $0,345 \pm 0,016 \text{mg.mL}^{-1}$). Activité PO L-DOPA : activité PO volumique mesurée sur la L-DOPA (40mM) à 492nm ; DO 220 : densité optique mesurée à 280nm ; DO 280 : densité optique mesurée à 280nm.

3. 1. 2. Elution du sérum de palourde

La figure 33 montre que l'échantillon déposé contient peu de protéines autres que celles possédant une activité de type PO. En effet, la densité optique mesurée à 220nm et, dans une moindre mesure à 280nm montre un pic correspondant aux fractions contenant la PO mais en dehors de ce pic, la densité optique est proche du bruit de fond. En utilisant l'hydroquinone comme substrat, il a été observé un pic d'activité qui se superpose à celui obtenu avec la L-DOPA, confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus, à savoir qu'il s'agit, dans le sérum d'hémolymph, principalement d'une activité de type laccase-like. Les deux pics obtenus, avec les deux substrats testés, indiquent que les fractions actives se situent à un volume d'élution entre 31,5 (fraction 21) et 43,5mL (fraction 29). A partir de la courbe d'étalonnage, réalisée avec les différents marqueurs de poids moléculaire, le poids moléculaire de la PO a été estimé à 72,8KDa. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus par Cong et collaborateurs (2005) qui avaient estimé le poids moléculaire de la PO de

V. philippinarum à 76,9KDa. Cela dit, cette même étude avait conclu à une activité principalement de type Tyrosinase ce qui n'est pas cohérent avec l'activité des fractions sur l'hydroquinone, substrat spécifique des laccases.

Le tableau 10 présente le bilan de purification à l'issue de la chromatographie de filtration sur gel. Les résultats montrent que la concentration sur unité d'ultrafiltration permet d'augmenter de 1,6 fois le facteur de purification. Le passage sur la colonne de chromatographie, quant à lui, ne permet pas d'augmenter le facteur de purification et provoque une baisse importante du rendement de purification. La quantité de protéines totales, quant à elle, ne diminue que très peu entre l'échantillon déposé sur la colonne et les fractions actives récoltées en fin de chromatographie. Cela confirme que le sérum d'hémolymphes a une diversité en protéines relativement faible mais n'explique pas la perte d'activité constatée lors du passage de l'échantillon sur la colonne de chromatographie. Cette technique n'est pas dénaturante et le temps moyen de cette chromatographie ayant été de 4 heures, la dégradation des protéines ne peut, à elle seule expliquer cette perte d'activité.

Tableau 10. Bilan de purification à l'issue de la chromatographie de filtration sur gel effectuée sur SEPHACRYL S-100. [Protéines] : concentration en protéines totales ; FP : Facteur de purification ; SEPHACRYL S-100 : fractions actives issues de la chromatographie.

	Volume (mL)	Activité PO (U/mL)	[Protéines] (mg/mL)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Activité totale (U I)	Rendement (%)	FP
Sérum	10	1,151	0,345	3,45	3,34	11,51	100	1
Sérum concentré 10,45 fois	0,8	12,85	2,31	1,85	5,56	10,28	89	1,67
SEPHACRYL S-100	13,5	0,189	0,118	1,59	1,60	2,552	22	0,48

3. 2. Chromatographie échangeuse d'ions

Une colonne « DEAE-Sepharose », échangeuse d'anions, a été équilibrée par du tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8,2. L'échantillon a été élué par un gradient de chlorure de sodium de 0,2 à 1M en solution dans le tampon d'équilibration.

Sur cette colonne de chromatographie, l'élution n'a pas permis d'améliorer la séparation des protéines contenues dans les fractions actives concentrées. Cela est dû au fait que les fractions actives semblent contenir relativement peu de protéines autres que la PO.

3. 3. Electrophorèse mono et bidimensionnelle et spectrométrie de masse

La chromatographie d'exclusion stérique a permis d'estimer le poids moléculaire de la PO de sérum et de constater la diversité relativement faible des protéines dans le sérum d'hémolymphe de palourde, tout du moins avec la coloration par le bleu de Coomassie. Le choix a donc été fait de concentrer les fractions actives directement issues de la sortie de chromatographie par exclusion stérique (concentration 13,5 fois par passage sur unité d'ultrafiltration 10,000 NMWL, AmiconTM) et de soumettre ce concentrat à une électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide, 12%, contenant du dodécylsulfate de sodium) afin de confirmer le poids moléculaire estimé par chromatographie (Figure 34).

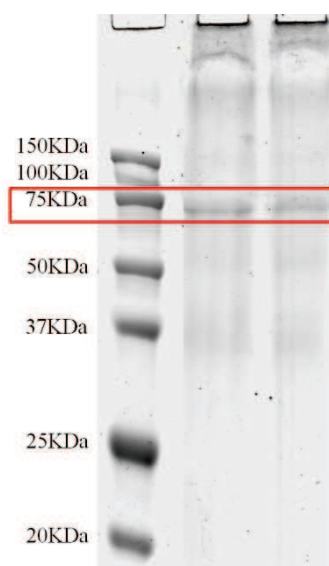


Figure 34. Photographie du gel de SDS-PAGE (12%) après migration d'extraits concentrés de fractions actives issues de chromatographie d'exclusion stérique.

A partir de ce gel (Figure 34), la masse molaire de la PO a été calculée à partir de la droite de régression linéaire du logarithme du poids moléculaire des différents marqueurs de taille en fonction de R_f où R_f est le rapport frontal de la distance parcourue par ces marqueurs de taille (a) sur la distance parcourue par le front de migration (b). La droite de régression linéaire obtenue ($R^2=0,99$) a pour équation :

$$R_f = 0,285 = -0,2766 \cdot \log M_w + 1,625$$

La masse molaire de la PO est donc égale à : $(0,285-1,625)/-0,2766 = 71207\text{Da}$, soit 71,2KDa. Ce résultat est cohérent avec la masse molaire estimée à partir de la chromatographie d'exclusion stérique qui était de 72,8KDa.

Les résultats confirment ceux obtenus par la chromatographie d'exclusion stérique, à savoir que la masse molaire de la PO est proche de 75KDa.

L'objectif de la suite des travaux de purification a été de déterminer la séquence génétique de la laccase partiellement purifiée. Pour ce faire, une électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée selon le protocole détaillé dans le chapitre 2 section 9.

Le gel obtenu au cours de cette électrophorèse bidimensionnelle est présenté dans la figure 35.

Le point isoélectrique a ainsi pu être estimé à 4,2.

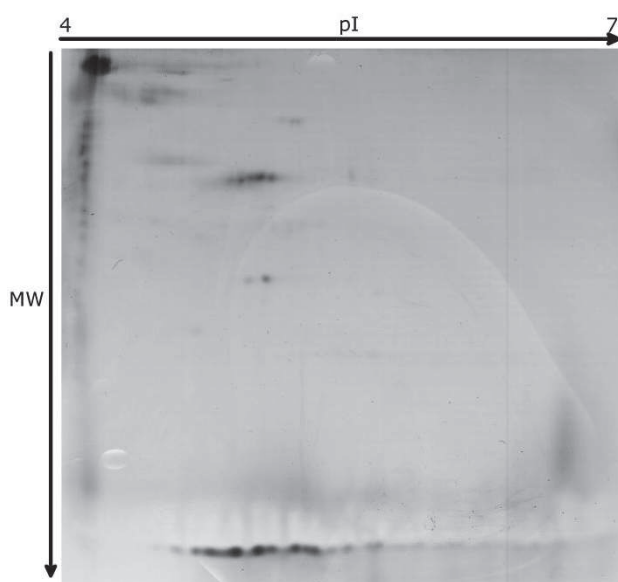


Figure 35. Photographie du gel d'électrophorèse bidimensionnelle (ph 4-7, SDS-PAGE 12%) obtenu après dépôt des fractions actives concentrées issues de la chromatographie d'exclusion stérique.

Le spot obtenu par électrophorèse bidimensionnelle a été excisé du gel et traité, comme indiqué dans la section 9.4. du chapitre 2, par la plateforme de spectrométrie de masse de l'UBO (Brest). Les résultats obtenus n'ont pas permis d'identifier de peptides, les spectrogrammes obtenus ne permettant ni la recherche dans les bases de données par la méthode PMF (peptide mass fingerprint) en spectrométrie de masse « simple », ni l'isolation d'ions pour l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MALDI TOF-TOF). La faible concentration des peptides aurait rendu ceux-ci difficilement discernables de la ligne de

base des spectrogrammes. Le choix a alors été fait de réitérer l'expérimentation en réalisant, non pas une électrophorèse bidimensionnelle mais une SDS-PAGE monodimensionnelle (12%) afin de collecter une quantité plus élevée de protéines.

La bande obtenue à l'issue de l'électrophorèse SDS-PAGE a donc subi le même traitement que le spot obtenu à l'issue de l'électrophorèse bidimensionnelle. Parallèlement, des échantillons de fractions actives concentrées, préalablement passés sur un concentrateur (SpeedVac), ont été digérés « In Solution » et également analysés par spectrométrie de masse.

Là encore, les résultats fournis par la plateforme de spectrométrie de masse de l'UBO (Brest) traduisent une concentration trop faible en peptides et n'ont pas permis l'identification des protéines.

4. Caractérisation biochimique de l'activité PO dans l'hémolymphe d'*Haliotis tuberculata*

Le long des côtes françaises et particulièrement des côtes bretonnes et normandes, une autre espèce que la palourde japonaise souffre d'épisodes de mortalité importants : l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*. Ce gastéropode, à forte valeur marchande, est en effet soumis à d'importantes mortalités, depuis une dizaine d'années, aussi bien dans les élevages que dans son milieu naturel (Huchette et Clavier, 2004). Les causes de ces mortalités ont été identifiées et la première d'entre elles est due à la bactérie pathogène *Vibrio harveyi* (Nicolas *et al.*, 2002). Pour que cette bactérie entraîne la vibriose et la mort des individus, sa présence doit coïncider avec des températures élevées et une immunodépression de l'organisme (Travers *et al.*, 2008, 2009). Cette immunodépression est elle-même liée à la gamétogénèse des animaux (Travers *et al.*, 2008) et a lieu à la fin de l'été, lorsque la température de l'eau est la plus élevée de l'année. L'ormeau européen est, tout comme *V. philippinarum*, un modèle d'étude du LEMAR, c'est pourquoi une étude comparative du système PO a été entreprise entre la palourde japonaise et l'ormeau européen. L'évolution de l'activité phénoloxydase (PO) en réponse à différents stress de nature biotique ou abiotique a déjà été étudiée chez plusieurs espèces d'ormeaux (Cheng *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c, 2004d, 2004e ; Travers *et al.*, 2008 ; Mottin *et al.*, 2010) mais la caractérisation biochimique de la PO n'a, à ce jour, jamais été réalisée. Tout comme pour la palourde japonaise, l'objectif principal de ce travail est donc de décrire le système PO d'un point de vue biochimique pour, à l'avenir, mieux comprendre

l'évolution des activités de ce système au sein de l'animal en réponse à des facteurs biotiques ou abiotiques. Bien que les expérimentations aient été moins poussées pour cette espèce que pour notre modèle principal d'étude, la caractérisation biochimique a été effectuée en utilisant différents substrats et inhibiteurs afin de définir la(les) sous-classe(s) présente(s) dans le sérum d'hémolymph de *H. tuberculata*. Les constantes cinétiques, pour les différentes conditions testées sont également des informations nécessaires à une meilleure compréhension du système PO. Ce travail a également pour objectif de purifier en partie la PO d'*H. tuberculata*. A terme, cette étude pourrait permettre de mieux comprendre la réponse immunitaire insuffisante au cours des vibrioses et des mortalités qui s'en suivent.

Article 2. Characterization of a laccase-like activity in the hemolymph of the abalone *Haliotis tuberculata*

Characterization of a laccase-like activity in the hemolymph of the abalone *Haliotis tuberculata*

Cédric Le Bris, Maxime Lepretre, Christine Paillard, Fabienne Guérard
UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER, LEMAR-IUEM-UBO, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest Iroise – Rue Dumont d’Urville, 29280 Plouzané, France

Abstract

Along French coasts, the abalone *Haliotis tuberculata* is affected by mass mortality events caused by both immune depression and the pathogen *Vibrio harveyi*. During this immune depression various immune parameters have been monitored including Phenoloxidase (PO) activity, which significantly decreases. Nevertheless the basal PO activity level, to date, has not been characterized biochemically and the PO subclass involved has not been identified. The aim of this study was to use various substrates and inhibitors, specific to one or more PO subclasses, to biochemically characterize enzymatic activity. Among specific and non-specific substrates, PO had the highest affinity for Dopamine ($K_m = 1.92$, $V_{max} = 0.086$). Tyrosinase-specific substrates were not oxidised whereas both laccase-specific substrates tested were oxidised. Results obtained with the different inhibitors tested are in agreement with results obtained with substrates. In fact, the laccase-specific CTAB totally inhibited PO activity and the IC₅₀ for this inhibitor was the lowest of any tested. The molecular weight has been estimated around 97KDa.

Keywords: *Haliotis tuberculata*; hemolymph; phenoloxidase; laccase; substrates; inhibitors.

1. Introduction

In 1960, *Haliotis tuberculata* mass mortalities were recorded along the French coasts of Brittany but these mortalities were explained by extreme cold temperatures during winter (Nicolas *et al.*, 2002). Since late 2000, this species has also been affected by mass mortality events in both wild and farmed populations along the French coasts of Brittany and Normandy (Huchette and Clavier, 2004). These mass mortality events, occurring at the end of the summer, are attributable to the pathogenic agent *Vibrio harveyi* (junior synonym: *Vibrio*

carchariae) (Nicolas *et al.*, 2002), but it is not the only cause. Mortality events occur only if the bacterium presence coincides with high temperature and with immune depression in the abalone (Travers *et al.*, 2009; Travers *et al.*, 2008). Furthermore, immature abalone are not affected by the vibriosis because the immune depression ties in with the spawning period (Travers *et al.*, 2008). In fact, there is an energetic trade-off between gametogenesis and the immune system, involving reallocation of energy from immune defenses to reproduction. Other causes of mass mortality events have been studied in abalone worldwide: *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Hasploridium montforti* in *Haliotis tuberculata* in Europe (Balseiro *et al.*, 2006); *Vibrio fluvialis* II in *H. discus hannai* in China (Li *et al.*, 1998); and *Pseudoklossia haliotis* sp in *Haliotis* spp in USA (Friedman *et al.*, 1995). Several studies have monitored the immune system of infected abalone through different immune parameters, such as total haemocyte count, phagocytosis or production of reactive oxygen species (ROS) (Hooper *et al.*, 2007). Another immune parameter recorded in abalone is the phenoloxidase (PO) cascade, which is modulated when exposed to various biotic or abiotic stresses. These modulations can be caused by intrinsic biotic factors such as gonad maturation and spawning events, which significantly decreased PO activity (Travers *et al.*, 2008). Other studies focus on abiotic factors, and experiments by Cheng *et al.* showed that when the abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, were exposed hypoxic conditions, PO activity significantly increased (Cheng *et al.*, 2004e). Otherwise, it has been reported that salinities ranging from 30 to 35‰ and temperatures from 24 to 30°C are optimal for this species growth, but when animals were transferred from 28°C to 20°C sea water, PO activity increased whereas it decreased when animals were transferred to sea water at 24 or 32°C (Cheng *et al.*, 2004c). There was also a decrease of PO activity when animals were transferred from 30‰ salinity seawater to 20, 25 or 35‰ salinity seawater (Cheng *et al.*, 2004d). In contrast, PO activity significantly increased in animals exposed to sea water with nitrite concentrations from 0.96 to 10.16 mg.mL⁻¹ (Cheng *et al.*, 2004a) and ammonia concentrations from 1.08 to 10.30mg.mL⁻¹ (Cheng *et al.*, 2004b). The effects of these compounds were studied because nitrite is an intermediate product of bacterial nitrification of ammonia. These PO responses were measured in order to evaluate the impact of abiotic factors on the susceptibility of the abalone to *Vibrio parahaemolyticus*. Mottin *et al.*, (Mottin *et al.*, 2010) studied another abiotic factor, showing that PO activity increased in a dose dependent manner in *H. tuberculata* haemocytes exposed to Zinc. Most often, these factors, whether biotic or abiotic, are considered separately, despite the fact that mortality events in *H. tuberculata* are associated with a combination of biotic and abiotic factors (Travers *et al.*, 2009; Travers *et al.*, 2008). PO has

also been explored at the genetic level to understand its role against the bacterium *V. harveyi*: the pathogen implied in mortality events in *H. tuberculata*. Partial silencing of two proPO genes resulted in a significant and strong PO activity reduction and a very high mortality in the shrimp *Penaeus monodon* after *V. harveyi* challenge (Amparyup *et al.*, 2009).

These different studies underline the importance of PO activity to evaluate the immune capacities of animals facing biotic or abiotic stresses; nevertheless, no study has focused on characterizing PO activity in the abalone to better understand its biochemical role and functioning. Previous studies showed that PO activity in the circulating hemolymph of the clam, *Venerupis philippinarum*, was mainly a laccase-like activity but there was also smaller-scale tyrosinase activity (Le Bris *et al.*, 2013). Thus, the aim of this study was to biochemically characterize the PO activity in the circulating hemolymph of *H. tuberculata* using various substrates and inhibitors, in order to determine which PO subclass is present from among the tyrosinases, catécholoxydases and laccases. The optimal pH was also determined and a partial purification of the enzyme was carried out to estimate its molecular weight.

2. Materials and methods

2. 1. Live material

Fifty-six adult abalone, *H. tuberculata*, 57.59 ± 3.19 mm shell length, were transferred from the hatchery at France Haliotis (Plouguerneau, France) to the LEMAR laboratory (University of Western Brittany) in March 2012. These abalone were maintained in aerated aquaria (100L) at room temperature (16°C) and acclimated for 5 days before sampling.

2. 2. Preparation of plasma samples

Just before sampling, animals were removed from their aquaria. Hemolymph of the 56 abalone was withdrawn from the cephalic arterial sinus in the anterior muscle, using a needle (25G 0.5 × 16 mm) fitted onto a 2 mL sterile syringe. The 85mL haemolymph collected from all abalone was pooled and centrifuged at 785g for 10 minutes at 4°C, to separate the cellular fraction (haemocytes) from the plasma (haemolymph, or HL). The resulting supernatant (i.e., plasma) was stored at -80°C until use in the assays. PO auto activation has been previously tested and after freezing at -80°C, PO was activated in HL (data not shown).

2. 3. Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (France); except for BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate used for total protein concentration, obtained from BioRad France; and Sephacryl S-100 chromatography media, obtained from GE Healthcare.

2. 4. Protein determination

The total protein content of *H. tuberculata* plasma was determined by the Bradford method (Bradford, 1976) using BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad France) and bovine serum albumin (BSA) as the protein standard.

2. 5. Phenoloxidase activity assays

PO activity was assayed spectrophotometrically in 96-well microplates (Greiner 96-F-bottom), by recording the formation of quinones according to the protocol of Le Bris et al. (2013). Briefly, 50μL Tris-HCl buffer (0.10 M, pH 8.2) was added to 50μL of HL, and this mixture was incubated for 10 minutes at 25°C. Then 100μL substrate, prepared at several concentrations, was added to each well. The plate was quickly mixed and placed in a microplate spectrophotometer (POLARstar OMEGA – BMG Labtech) to measure absorbance (A) at 25°C immediately after the substrates were added. PO activity was then monitored for 30 minutes following the increase of absorbance at the substrate-specific wavelength. At the same time, the spontaneous oxidation of each substrate was measured by replacing HL with pure water in blank runs, and the values obtained were subtracted from test values. Buffer controls (containing 50μL HL, 50μL pure water and 100μL substrate) and substrate controls (containing 50μL HL, 50μL Tris-HCl buffer and 100μL pure water) were also carried out. For each treatment, controls, samples and blanks were tested in triplicate. PO activity was estimated based on the increment in the rate of absorbance (A) per minute obtained from the slope of the linear region from the plot of absorbance on time. The PO specific activities were expressed in arbitrary Unit (U) per milligram of total protein. One U is defined as the quantity of enzyme that, in optimum conditions of pH, temperature and substrate saturation, produces 1μmol of product per minute. PO specific activity values were obtained as follows:

$$\text{PO specific activity} = (\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \times \text{dilution factor}) / \text{Total protein concentration}$$

2. 5. 1. Substrates

A number of different potential substrates were tested. These substrates could be tyrosinase-specific (monophenols), laccase-specific (metoxiphenols, p-diphenols and non-phenolic substrates) or o-diphenols, which may or may not be oxidized directly by each PO subclass.

L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) and dopamine were used as substrates common to all three PO subclasses. L-tyrosine and p-hydroxyphenyl propionic acid (PHPPA) were used as a tyrosinase-specific substrates. P-phenylenediamine (PPD) and 1,4-benzenediol (hydroquinone) were used as laccase-specific substrates. Substrate solutions were prepared in pure water just before use except for PPD which was prepared in methanol. Each time it was possible, the Michaelis-Menten constant (K_m) and the maximum reaction velocity (V_{max}) were obtained from the Lineweaver-Burk equation, a linear transformation of the Michaelis equation. An Eadie-Hofstee plot was also made to calculate the inhibition constant K_i when there was an excess-substrate inhibition.

2. 5. 2. Phenoloxidase inhibition assay

A PO inhibition assay was performed by preincubating 50 μ L PO inhibitor (prepared at various concentrations) in Tris-HCl buffer with 50 μ L HL for 10 minutes at 25°C. A PO assay was then carried out with 100 μ L L-DOPA (0.04 M) dissolved in pure water.

Kojic acid, citric acid and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were tested as potential common PO inhibitors. 4-Hexylresorcinol (4-Hr) and salicylhydroxamic acid (SHAM) were tested as potential tyrosinase- and catecholase-specific inhibitors. Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) was tested as a potential laccase inhibitor. Dose-response curves were plotted and calculations were performed to identify the concentration corresponding to the maximum of inhibition and the concentration causing 50 per cent inhibition (IC₅₀).

2. 6. Partial purification

4.75 mL hemolymph supernatant from the 85mL pooled was desalted and concentrated using Centricon devices with ultracel YM-10 membrane (10,000 NMWL, AmiconTM), resulting in 0.9 mL of concentrated HL. This solution was loaded onto a Sephacryl S-100 column (86 mL – Fractionation range from 10 to 100KDa) and eluted with Tris-HCl buffer 0.1 M (pH 8.2). The 46 fractions were collected with 1.5 mL per tube at an outflow equal to 0.61mL.min⁻¹. Cytochrome C from equine heart (12KDa), carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (29KDa) and albumin from bovine serum (66KDa) were used for the column calibration. The fraction's ultraviolet absorption was monitored at 220 (data not shown) and 280 nm to detect proteins and PO activity of the different fractions was measured with L-DOPA 0.04 M and also with the laccase-specific substrate Hydroquinone (0.025 M) at 492 and 390nm respectively.

2. 7. Optimum pH

To assay the influence of pH on PO activity, 50 μ L hemolymph was added to 50 μ L Tris-HCl 0.1M buffer at pH values between 7.5 and 10.5. These mixtures were incubated for 10min at 25°C before adding 100 μ L L-DOPA (0.04 M) and measuring PO specific activity (as described in section 2-5) in U per mg total protein.

2. 8. Statistical analysis

All values are given as means \pm standard deviation (SD) and all statistical analyses were carried out using STATGRAPHICS Plus 5.1.

3. Results

3. 1. Optimal pH

The effect of pH on abalone PO activity was studied over the pH range 7.0-10.5 using Tris-HCl buffer and 0.04 M L-DOPA as substrate. Under these conditions, PO activity did not exhibit a maximum and PO activity increased throughout the tested pH range. The non-enzymatic oxidation also increased across the tested pH range. PO activity strongly increased for pH values from 7.5 to 9.0, while activity increased more slowly above pH 9.0 (Fig. 1).

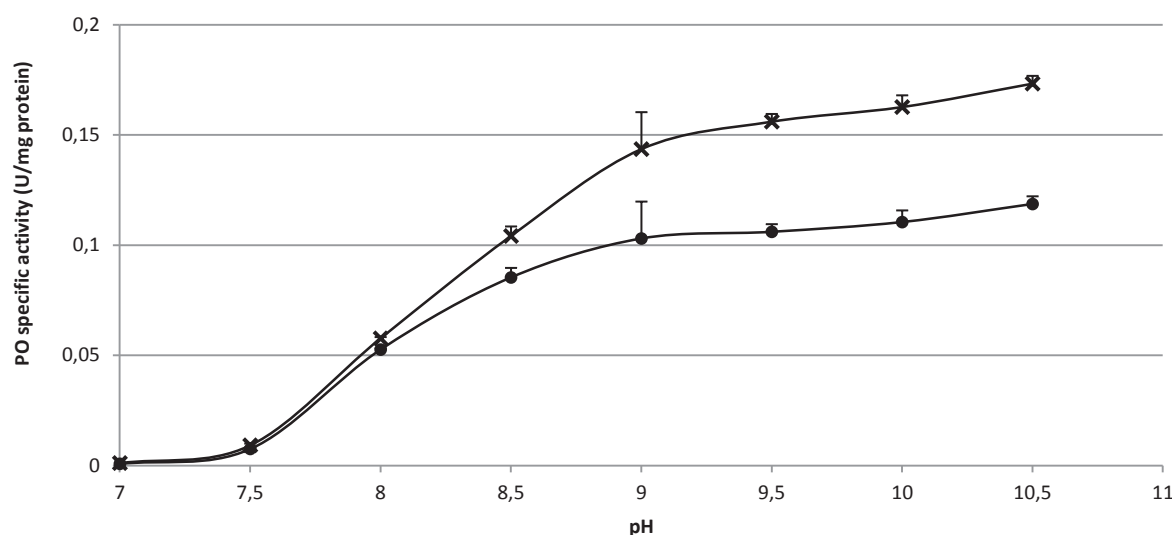


Fig. 1. Effect of pH on *Haliotis tuberculata* PO activity. Crosses represent PO activity without the correction from non-enzymatic oxidation and points represent PO activity corrected from the non-enzymatic oxidation.

However, the choice was made to work at pH 8.2 to avoid auto-oxidation of the substrate and thus to maintain it in excess during activity assays; this pH value also corresponds to sea water pH.

3. 2. Protein assay

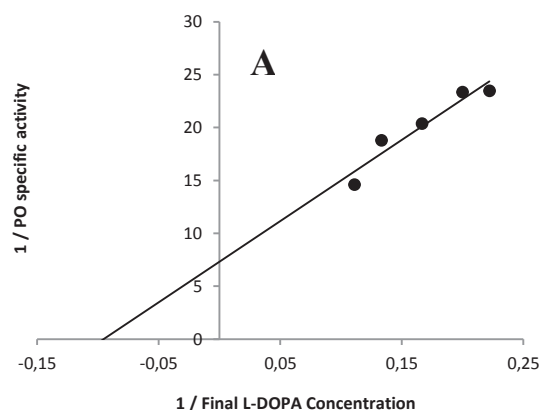
The total protein concentration was determined by the Bradford method on the pool of hemolymph supernatant collected from 56 abalone. The average value of the total protein concentration was $20.44 \pm 1.66 \text{ mg.mL}^{-1}$.

3. 3. Phenoloxidase assays

In order to biochemically characterize the phenoloxidase activity in the abalone *H. tuberculata*, enzymatic assays were done using different substrates and inhibitors, specific to one or more phenoloxidase subclasses. For all substrates and inhibitors tested, enzymatic oxidation results were systematically corrected for non-enzymatic auto-oxidation.

3. 3. 1. Phenoloxidase activity assays on different substrates

For non-specific PO substrates, PO-like activity was detected in the presence of L-DOPA ($K_m = 10.50 \text{ mM}$, Fig. 2) and Dopamine, which was the substrate for which the PO had the highest affinity. In Dopamine a decrease of PO activity was observed for substrate concentrations above 10 mM . The K_m value calculated for concentrations ranging from 0 to 10 mM was 1.92 mM , however, for Dopamine concentrations higher than 10 mM , there was excess-substrate inhibition and the substrate inhibition constant was calculated as 26.91 mM . V_{\max} values for Dopamine and L-DOPA were 0.137 and $0.086 \text{ U.mg}^{-1} \text{ protein}$, respectively, so K_m followed the same ranking, where the highest affinity was observed for Dopamine ($K_m = 1.92 \text{ mM}$).



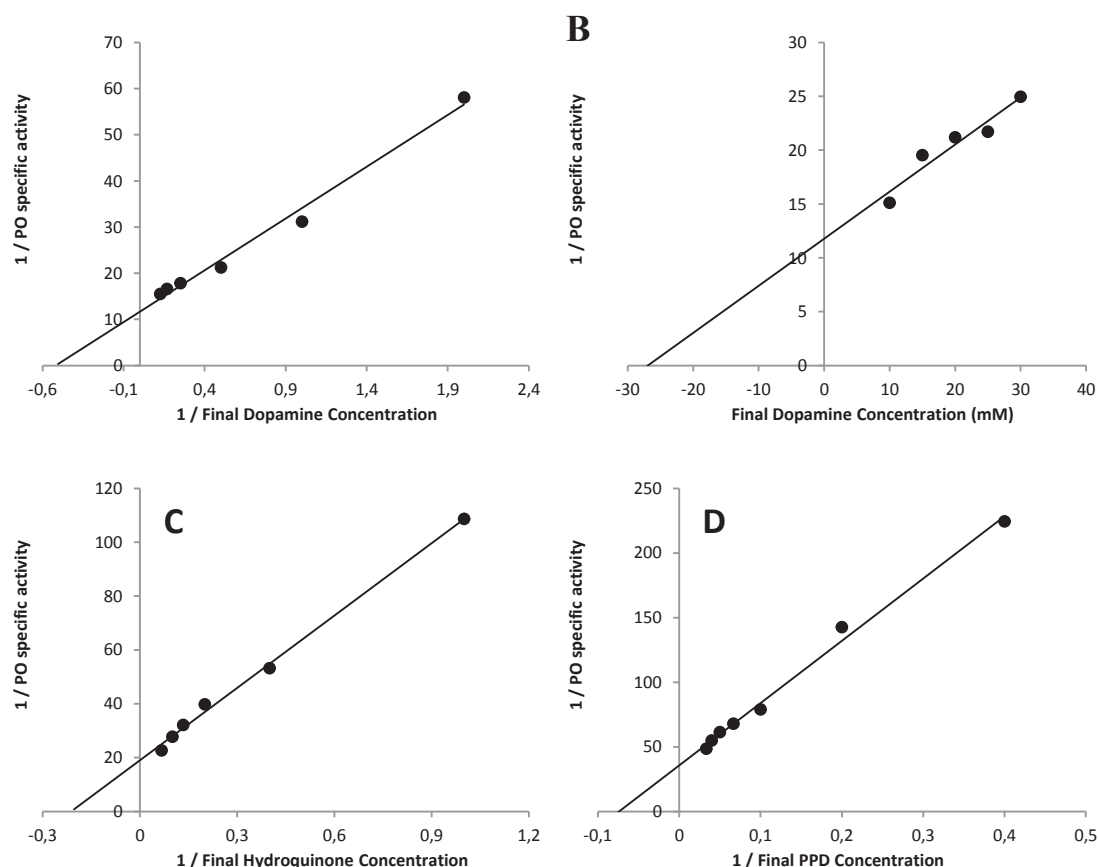


Fig. 2. Kinetic properties of *Haliotis tuberculata* PO. (A) L-DOPA: Lineweaver-Burk plot for concentrations ranging from 4.5 to 9mM. (B) Dopamine: Lineweaver-Burk plot for concentrations ranging from 0.5 to 8mM (Left) and plot of 1/PO specific activity according to final substrate concentration ranging from 10 to 30mM (right). (C) Hydroquinone: Lineweaver-Burk plot for concentrations ranging from 1 to 15 mM. (D) PPD: Lineweaver-Burk plot for concentrations ranging from 2.5 to 30mM. PO specific activity values are the means of assays \pm S.D.

When tyrosinase-specific substrates were used, no activity was detected either with L-Tyrosine or PHPPA.

Finally, hydroquinone and PPD, which are laccase-specific substrates, were tested. K_m value was calculated as 4.72 mM for the p-diphenol hydroquinone and as 13.51 mM for the aromatic amine PPD. V_{max} values were lower than for non-specific substrates and were calculated as 0.029 and 0.053 for PPD and hydroquinone respectively. Results are summarized in Table 1 and lead to the conclusion that PO in *H. tuberculata* exhibits a laccase-like activity.

Table 1. Tested substrates with their corresponding wavelengths and kinetic constants. L-DOPA: L-3,4-dihydroxyphénylalanine; PHPPA: 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid; PPD: P-phenylenediamine; Ø: not-determined.

Substrate specificity	Type of substrate	substrate	Final substrate concentrations tested (mM)	Wavelengths (nm)	Km (mM)	Vmax (u/mg protein)
non-specific	Ortho-diphenol	Dopamine	30 to 0.5	492	1.92	0.086
		L-DOPA	25 to 1.5	492	10.50	0.137
Laccase	Para-diphenol	Hydroquinone	35 to 1	390	4.72	0.053
	Non-phenolic	PPD	45 to 2.5	420	13.51	0.029
Tyrosinase	Monophenol	Tyrosine	25 to 2.5	492	Ø	Ø
		PHPPA	60 to 5	492	Ø	Ø

3. 3. 2. Consequences of dose-response inhibitors on phenoloxidase activity

For the characterization of PO-like activity in the plasma from *H. tuberculata*, different inhibitors, prepared at various concentrations, were used. For these assays the common substrate, L-DOPA, was used and for each inhibitor the concentration responsible for maximum inhibition and IC₅₀ were calculated. For each assay, enzymatic oxidation results were systematically corrected for non-enzymatic auto-oxidation. Results are summarized in Table 2. The three non-specific inhibitors tested, EDTA, Citric acid and Kojic acid, totally inhibited PO activity. For these inhibitors, IC₅₀ values follow the same ranking as concentration values for maximum inhibition. The lowest IC₅₀ value was observed for EDTA (IC₅₀ = 1.02 mM) and this was associated with the lowest concentration leading to total PO activity inhibition (3.5 mM). Among the three inhibitors tested, kojic acid seemed to be the least effective as its IC₅₀ value was 2.19 mM and 8 mM were necessary to achieve total inhibition of enzymatic activity. The catecholase and tyrosinase specific inhibitors, SHAM and 4-Hr were not as effective as non-specific inhibitors; neither totally inhibited PO activity. For 4-Hr, the maximal inhibition was less than 50% so the IC₅₀ value could not be calculated. The laccase-specific inhibitor, 0.5mM CTAB, exerted total inhibition of PO activity and its

IC50 value was lower than for all others (Table 2). The results obtained with inhibitors confirm the results obtained with different substrates, i.e. that PO in *H. tuberculata* exhibits a laccase-like activity.

Table 2. Inhibition constants for the different inhibitors tested. Concentrations shown are those for which inhibition was maximal. IC 50 corresponds to the concentration for which the inhibition was equal to 50%.

Specificity	Inhibitors	Concentration (mM)	Maximum of inhibition (%)	IC 50 (mM)
Non-specific	EDTA	3.5	100	1.02
	Citric acid	4	100	1.63
	Kokic acid	8	100	2.19
Laccase	CTAB	0.5	100	0.17
Catecholase and tyrosinase	SHAM	10	73.63	3.32
	4-Hr	3	47.69	

3. 4. Partial purification

A sample of 0.9mL of concentrated HL, with a total protein concentration of 116 ± 2.75 mg.mL⁻¹, was loaded to a Sephacryl S-100 column (Fig. 3). Enzyme activity was measured using both L-DOPA and hydroquinone. Peak fractions with high enzymatic activities on 0.04 M L-DOPA were collected in eluted volumes 33-36mL (Fig. 3). Using the laccase-specific substrate, 25 M Hydroquinone, peak fractions with high enzymatic activities were collected in the same fractions but intensities of PO activities were different (Fig. 3). In fact, in eluted volumes 33-36mL PO activity was higher using Hydroquinone than using L-DOPA. The calibration curve, plot using the known molecular weight proteins, allowed the molecular weight of proteins in active fractions to be calculated: fractions 22-24 corresponded to 97KDa proteins.

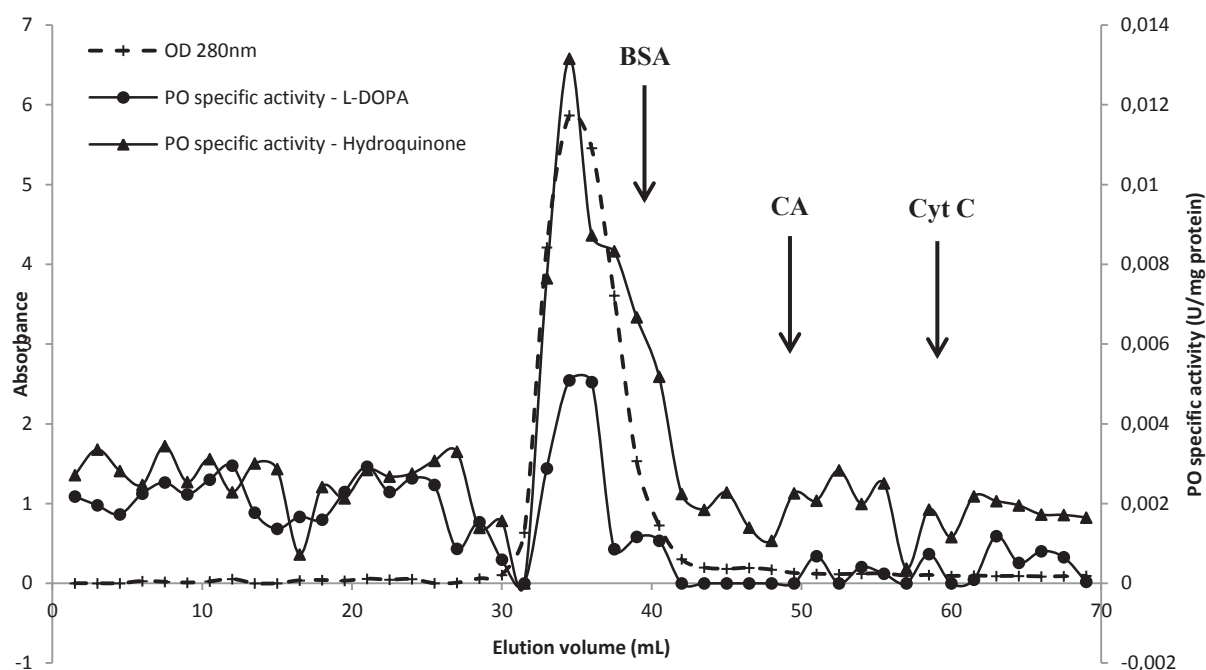


Fig. 3. Column chromatography of concentrated HL from *H. tuberculata*. 0.9mL of $116 \pm 2.75 \text{ mg.mL}^{-1}$ concentrated HL was applied to a Sephacryl S-100 column and eluted with Tris-HCl buffer 0.1M (pH 8.2). Fractions 22-24 contained the highest enzymatic activity on 0.025 M hydroquinone whereas fractions 49-56 contained the highest enzymatic activity on 0.040 M L-DOPA. Molecular weight markers are indicated as a function of their elution volume: BSA: Bovine Serum Albumin, 66KDa; CA: carbonic anhydrase, 29KDa; Cyt C: Cytochrome C, 12KDa.

4-Discussion

In various invertebrates, stresses increase the incidence of disease outbreaks and mass mortalities, and in *Haliotis tuberculata*, the link between stress and immune response has already been shown (Malham *et al.*, 2003). In this study, we focused on the basal phenoloxidase activity and we described for the first time a laccase-like activity in hemolymph serum of abalone *H. tuberculata*. Some studies have already focussed on phenoloxidase activity in different abalone species dealing with biotic and abiotic stresses. Cheng *et al.*, monitored the impact of different abiotic factors such as ammonia (Cheng *et al.*, 2004b), temperature (Cheng *et al.*, 2004c), salinity (Cheng *et al.*, 2004d), dissolved oxygen (Cheng *et al.*, 2004e) and nitrite (Cheng *et al.*, 2004a) on PO activity to estimate *H. diversicolor supertexta* immune response capability and its susceptibility to *V. parahaemolyticus*. PO activity was also used as a bioindicator for the summer immune

depression associated with *V. harveyi* infections (Travers *et al.*, 2008). Nevertheless, to date, there have been no previous studies dealing with the basal phenoloxidase activity and especially no studies biochemically describing this enzymatic activity. In this study, our primary objective was to determine which of the three PO subclasses is present in *H. tuberculata* hemolymph. The three enzyme subclasses of PO are the catecholases (EC 1.10.3.1), the laccases (EC 1.10.3.2) and the tyrosinases (EC 1.14.18.1). These subclasses may be differentiated using different substrates and different inhibitors specific to one or more PO subclasses. In our study, the most common substrate used, L-DOPA (Benjakul *et al.*, 2005; Campello *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007; Perdomo-Morales *et al.*, 2007) didn't exhibit the lowest K_m value. In fact, Dopamine and L-DOPA were tested as non-specific substrates and Dopamine had the lowest K_m value. Consequently, PO affinity was higher for Dopamine than for L-DOPA (1.92 mM and 10.50 mM respectively). Similar results were obtained with PO in the insect *Apis mellifera* (Zufelato *et al.*, 2004). However, in our study, the V_{max} value was higher for L-DOPA than for Dopamine (0.137 and 0.086 respectively) meaning that the reaction velocity was higher for L-DOPA. This result underlines the fact that when measuring PO activity, L-DOPA should not be the only substrate considered as it is not always the "best". As described in the Manila clam *Venerupis philippinarum* (Le Bris *et al.*, 2013) and in the crustacean *Palinurus elephas* (Brack *et al.*, 2008), in the abalone *H. tuberculata*, above some dopamine threshold concentrations, there was excess-substrate inhibition. Monophenols are tyrosinase-specific substrates but no significant activities were detected with either Tyrosine or PHPPA as substrate in the hemolymph serum of the abalone. Even if the PO activity level was lower using PHPPA than with non-specific substrate, there was significant tyrosinase-like activity in serum of *V. philippinarum* (Le Bris *et al.*, 2013). Our result in *H. tuberculata* also differed from results obtained from another gastropod, *Biomphalaria glabrata*, where egg mass supernatant oxidised L-tyrosine (Bai *et al.*, 1997; Bai *et al.*, 1996). Our results are consistent with those obtained in the plasma of *C. gigas* where no tyrosinase-specific substrates were oxidised (Luna-Acosta *et al.*, 2010). In order to detect a laccase activity, two specific substrates were used. The first, hydroquinone, was a p-diphenol and the PO affinity for this was stronger than for the common substrate L-DOPA (K_m values were 4.72 mM and 1.92 mM respectively), even if the PO velocity for Hydroquinone remained around 2.5 times lower than for L-DOPA. The other laccase-specific substrate, PPD, was non-phenolic and was also oxidised, although the affinity was lower than for other substrates. Results obtained by assaying PO activity in hemolymph supernatant of *H. tuberculata* using several substrates led to the conclusion that PO activity is due to laccase-like activity.

To verify the presence of laccase activity we used different specific inhibitors. The laccase-specific inhibitor, CTAB (Allan and Walker, 1988; Martínez-Alvarez *et al.*, 2008), could be completely inhibited and the IC₅₀ value was the lowest of all inhibitors tested (0.17 mM). This total inhibition confirms that PO activity in hemolymph of *H. tuberculata* is due to laccase-like activity. Nevertheless, two inhibitors that are considered to be both catecholase- and tyrosinase-specific were also tested: SHAM and 4-Hr (Allan and Walker, 1988; Dawley and Flurkey, 1993; Luna-Acosta *et al.*, 2010; Montero *et al.*, 2004). For both inhibitors, the inhibition exerted was not total. In fact, for SHAM and 4-Hr, the maximum inhibition was equal to 73.63 and 47.69% respectively. However, the efficacy and especially the specificity of these two inhibitors are questionable. A previous study (Le Bris *et al.*, 2013) found that PO activity is greatly inhibited by SHAM using hydroquinone as a substrate even though a tyrosinase- and catecholase-specific inhibitor should not lead to inhibition of oxidation of a laccase-specific substrate such as hydroquinone. The other tyrosinase- and catecholase-specific inhibitor that was tested was 4-Hr and this displayed low inhibition of PO activity (47.69% for concentrations equal or superior to 3 mM). Therefore non-laccase-like PO activity, if present, is likely to be minor and not detectable with the tyrosinase- and catecholase-specific substrates tested here. Three non-specific inhibitors were also tested and all of them led to total inhibition of PO activity but none of them had an IC₅₀ value lower than that of CTAB. In comparison with the inhibition of PO activity in *V. philippinarum*, these inhibitors seemed to be less effective as both IC₅₀ values and concentration values to obtain total inhibition were higher (Le Bris *et al.*, 2013). Nevertheless, the inhibitory effect of EDTA appeared to be substantially higher than in other species: 3.5 mM EDTA led to total PO activity inhibition whereas in *Saccostrea glomerata* 25 mM EDTA led to 96% inhibition (Aladaileh *et al.*, 2007); in *Charybdis japonica* 20 mM EDTA led to 76% inhibition (Liu *et al.*, 2006); and in *Penaeus californiensis* 10 mM EDTA led to 36.30% inhibition of the PO activity (Gollas-Galván *et al.*, 1999). Given that EDTA is known as a specific copper chelator (Feng *et al.*, 2008), our results confirm that PO in *H. tuberculata* has properties of a metalloenzyme as described for other species (Cong *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Marusek *et al.*, 2006; Zibae *et al.*, 2011). Studying potential inhibitors may be important to understand the different mechanisms in which PO activity is involved. The use of effective inhibitors could allow a better understanding of mechanisms established during brown protein depositions occurring in different abalone species (Huchette *et al.*, 2006; Marshall and Day, 2001; Shepherd and Huchette, 1997; Shepherd and Triantafillos, 1997). Since PO is directly implied in the synthesis of melanin (and its derivatives) (Espín *et al.*, 2000), it may be

involved in conchiolin deposition in infected abalone shell, which appears to be similar to the Brown Ring Disease (BRD) of clams (Huchette *et al.*, 2006). More generally, it could be interesting to study the role of PO on biomineral repair of abalone shell apertures which occur when the shell is growing and when new apertures are formed along the animal's dorsal margin (Cusack *et al.*, 2013). Different effective inhibitors could also be used to understand interactions occurring in Vibriosis, as pathogens such as *Vibrio Carchariae* are able to produce serine proteases (Lee *et al.*, 2002) which are known to be activators of the PO synthesis pathway (Cerenius *et al.*, 2010; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Kanost *et al.*, 2001). The use of different substrates and inhibitors here led us to the conclusion that PO in serum of *H. tuberculata* is laccase-like, even if there was potentially a catecholase or tyrosinase activity which was too low to oxidise specific substrates.

The partial purification allowed us to conclude that laccase in the hemolymph of *H. tuberculata* had a molecular weight equal to 97KDa. This was heavier than PO in *V. philippinarum* (molecular weight 76.9KDa (Cong *et al.*, 2005)) and the gastropod *B. glabrata* (molecular weight 35KDa (Bai *et al.*, 1997)) but was lighter than PO from *Crassostrea virginica* (molecular weight 133KDa (Jordan and Deaton, 2005)).

Our experiment did not allow us to determine the optimal pH for PO. In fact PO level activity continued to increase with increasing pH values, though substrate auto-oxidation and enzymatic activity seemed to be more or less stabilized for pH values above 9. This increase in PO activity with increasing pH may be the result of biochemical interactions with other molecules present in the plasma. To confirm this hypothesis, the same experiment could be repeated using purified PO, though this would require more biological material. As an optimal pH value could not be determined we made the choice to work at the sea water pH value (i.e. 8.2), avoiding auto-oxidation and thus keeping the substrate in excess for assays.

This study allows us to conclude that PO activity in the abalone *H. tuberculata* is mainly due to laccase-type activity and that laccase in this species has a molecular weight of 97KDa. Purification experiments should be continued particularly to test for the presence of low level tyrosinase or catecholase activity, and also to refine our search for optimal pH. Future studies could also investigate whether different isoforms act at different times, e.g. according to disease stage. It would also be interesting to study activity during abalone larval stages, in which individuals are especially susceptible to stress and when mortalities strongly influence recruitment (Huchette *et al.*, 2006).

Acknowledgements

This work was funded by University of Western Brittany. We would first like to thank Sylvain Huchette and France Haliotis (Plouguerneau, France) company for providing the abalone. We thank Adeline Bidault-Toffin and Nelly Le Goïc for their help and their technical assistance. Special thanks are addressed to Ewan Harney for linguistic revision.

References

- Aladaileh, S., Rodney, P., Nair, S.V., Raftos, D.A., 2007. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 148, 470-480.
- Allan, A.C., Walker, J.R., 1988. The selective inhibition of catechol oxidases by salicylhydroxamic acid. *Phytochemistry* 27, 3075-3076.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2009. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology* 33, 247-256.
- Bai, G., Brown, J.F., Watson, C., Yoshino, T.P., 1997. Isolation and Characterization of Phenoloxidase from Egg Masses of the Gastropod Mollusc, *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 118, 463-469.
- Bai, G., Li, J., Christensen, B.M., Yoshino, T.P., 1996. Phenoloxidase activity in the reproductive system and egg masses of the pulmonate gastropod, *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 114, 353-359.
- Balseiro, P., Aranguren, R., Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., 2006. *Candidatus* Xenohaliotis californiensis and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture* 258, 63-72.
- Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M., 2005. Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Journal of food biochemistry* 29, 470-485.
- Brack, A., Hellmann, N., Decker, H., 2008. Kinetic Properties of Hexameric Tyrosinase from the Crustacean *Palinurus elephas*†. *Photochemistry and photobiology* 84, 692-699.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Campello, S., Beltramini, M., Giordano, G., Di Muro, P., Marino, S., Bubacco, L., 2008. Role of the tertiary structure in the diphenol oxidase activity of *Octopus vulgaris* hemocyanin. *Archives of biochemistry and biophysics* 471, 159-167.
- Cerenius, L., Babu, R., Söderhäll, K., Jiravanichpaisal, P., 2010. *In vitro* effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *Journal of invertebrate pathology* 103, 21-23.
- Cheng, W., Hsiao, I.-S., Chen, J.-C., 2004a. Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Diseases of aquatic organisms* 60, 157-164.
- Cheng, W., Hsiao, I., Chen, J.-C., 2004b. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 17, 193-202.

- Cheng, W., Hsiao, I., Hsu, C.-H., Chen, J.-C., 2004c. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 17, 235-243.
- Cheng, W., Juang, F.-M., Chen, J.-C., 2004d. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology* 16, 295-306.
- Cheng, W., Li, C.-H., Chen, J.-C., 2004e. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 232, 103-115.
- Cong, R., Sun, W., Liu, G., Fan, T., Meng, X., Yang, L., Zhu, L., 2005. Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish & shellfish immunology* 18, 61-70.
- Cusack, M., Guo, D., Chung, P., Kamenos, N.A., 2013. Biomineral repair of Abalone shell apertures. *Journal of structural biology*.
- Dawley, R.M., Flurkey, W.H., 1993. Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexyl-resorcinol, a tyrosinase inhibitor. *Phytochemistry* 33, 281-284.
- Espín, J.C., Varón, R., Fenoll, L.G., Gilabert, M., García-Ruiz, P.A., Tudela, J., García-Cánovas, F., 2000. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *European Journal of Biochemistry* 267, 1270-1279.
- Feng, C., Song, Q., Lü, W., Lu, J., 2008. Purification and characterization of hemolymph prophenoloxidase from *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 151, 139-146.
- Friedman, C.S., Gardner, G.R., Hedrick, R.P., Stephenson, M., Cawthorn, R.J., Upton, S.J., 1995. *Pseudoklossia haliotis* sp. n. (Apicomplexa) from the kidney of California abalone, *Haliotis* spp. (Mollusca). *Journal of invertebrate pathology* 66, 33-38.
- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F., 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 122, 77-82.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handlinger, J., Benkendorff, K., 2007. Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 363-379.
- Huchette, S., Clavier, J., 2004. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *Journal of Shellfish Research* 23, 951-956.
- Huchette, S., Paillard, C., Clavier, J., Day, R., 2006. Shell disease: abnormal conchiolin deposit in the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of aquatic organisms* 68, 267-271.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211, 213-236.
- Jordan, P.J., Deaton, L.E., 2005. Characterization of phenoloxidase from *Crassostrea virginica* hemocytes and the effect of *Perkinsus marinus* on phenoloxidase activity in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Geukensia demissa*. *Journal of Shellfish Research* 24, 477-482.
- Kanost, M.R., Jiang, H., Wang, Y., Yu, X.-Q., Ma, C., Zhu, Y., 2001. Hemolymph proteinases in immune responses of *Manduca sexta*, Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System. Springer, 319-328.
- Le Bris, C., Paillard, C., Stiger-Pouvreau, V., Guérard, F., 2013. Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties. *Fish & Shellfish Immunology* in press.
- Lee, K., Liu, P., Chuang, W., 2002. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology* 4, 267-277.

- Li, T., Ding, M., Zhang, J., Xiang, J., Liu, R., 1998. Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *Journal of Shellfish Research* 17, 707-711.
- Liu, G., Yang, L., Fan, T., Cong, R., Tang, Z., Sun, W., Meng, X., Zhu, L., 2006. Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*. *Fish & shellfish immunology* 20, 47-57.
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2007. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 33593-33598.
- Luna-Acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., 2010. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 719-726.
- Malham, S.K., Lacoste, A., Gelebart, F., Cueff, A., Poulet, S.A., 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* 295, 136-144.
- Marshall, D.J., Day, R., 2001. Change in the rate of shell deposition and shell microstructure in response to shell borers in the abalone *Haliotis rubra*.
- Martínez-Alvarez, O., Montero, P., Gómez-Guillén, C., 2008. Evidence of an active laccase-like enzyme in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chemistry* 108, 624-632.
- Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., Inlow, J.K., 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of inorganic biochemistry* 100, 108-123.
- Montero, P., Martínez-Álvarez, O., Gómez-Guillén, M., 2004. Effectiveness of Onboard Application of 4-Hexylresorcinol in Inhibiting Melanosis in Shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Journal of food science* 69, C643-C647.
- Mottin, E., Caplat, C., Mahaut, M.-L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.-M., Serpentine, A., 2010. Effect of *in vitro* exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 846-853.
- Nicolas, J.-L., Basuyaux, O., Mazurie, J., Thebault, A., 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of aquatic organisms* 50, 35-43.
- Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Perera, E., Pardo-Ruiz, Z., Alonso-Jiménez, E., 2007. Phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 1187-1195.
- Shepherd, S., Huchette, S., 1997. Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*) XVIII. Ring formation in *H. scalaris*. *Molluscan Research* 18, 247-252.
- Shepherd, S., Triantafillos, L., 1997. Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*) XVII. A chronology of *H. laevigata*. *Molluscan Research* 18, 233-245.
- Travers, M.-A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J.-L., Koken, M., Paillard, C., 2009. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology* 15, 1365-1376.
- Travers, M.-A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 800-808.
- Zibae, A., Bandani, A.R., Malagoli, D., 2011. Purification and characterization of phenoloxidase from the hemocytes of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 158, 117-123.

Zufelato, M.S., Lourenço, A.P., Simões, Z.L., Jorge, J.A., Bitondi, M.M., 2004. Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 1257-1268.

Chapitre 4 :

Rôle de deux enzymes clé,
la phénoloxydase et la superoxyde
dismutase, dans la réponse
immunitaire de la palourde
japonaise, *V. philippinarum*,
exposée à *V. tapetis*

1. Etude préliminaire : recherche d'un cycle endogène pour les activités PO et SOD chez la palourde japonaise

1. 1. Introduction

Dans le chapitre précédent, l'activité phénoloxydase du sérum de la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* a été caractérisée d'un point de vue biochimique. Le sérum utilisé pour ces expérimentations était issu d'un pool d'hémolymphe collecté sur plus de 400 palourdes pour que la variabilité interindividuelle soit « gommée » par le nombre important d'individus échantillonnés. Cependant, d'autres variabilités « naturelles » peuvent exister et biaiser l'interprétation de résultats obtenus dans les expérimentations suivantes. En effet chez la palourde japonaise, plusieurs cycles ont été mis en avant notamment en fonction des saisons. Ainsi, il a été démontré que l'indice de condition (IC), le nombre total d'hémocytes et la taille de ces derniers étaient fortement impactés par les variations saisonnières (Soudant *et al.*, 2004). Les valeurs d'IC sont les plus fortes au cours de l'été et chutent de façon importante au moment des pontes à la fin de l'été (Paillard, 1992, Laruelle *et al.*, 1994). Soudant *et al.* (2004) ont également montré que les valeurs les plus élevées en hémocytes totaux et en contenu protéique sont observées au cours du printemps et de l'été. Pour chacune des expérimentations suivantes, les individus ont été prélevés au même moment et sur le même site pour annuler un biais potentiel entraîné par la saisonnalité et, plus particulièrement, les variations des paramètres environnementaux.

L'existence d'un autre type de cycle, celui-ci endogène lié à la consommation d'oxygène, a été démontré chez la palourde japonaise (Kim *et al.*, 1999). En effet, des individus ont été prélevés en milieu naturel, transportés au laboratoire et maintenus dans des conditions contrôlées et constantes en température, lumière, alimentation et oxygénation pendant 9 semaines avant le début des mesures. La respiration des individus, 9 semaines après leur prélèvement dans le milieu naturel, montre un rythme circatidal correspondant à une périodicité semi-diurne, ce qui coïncide avec le cycle des marées du site d'origine de ces animaux. Le fait que ce cycle soit observable alors que les animaux étaient maintenus depuis 9 semaines dans des conditions constantes et en l'absence de marée amène à la conclusion qu'il s'agit d'un cycle endogène. Des travaux similaires ont été conduits chez l'huître *Crassostrea gigas* à travers l'étude, non pas de la consommation en oxygène mais de l'ouverture des valves. Ainsi, un suivi en laboratoire pendant 2 mois a montré que, chez cette espèce, il existe un cycle circadien modulable (par variations des périodes de jour et de nuit) mais aucun cycle circatidal n'a été observé au cours de ces expérimentations (Mat *et al.*,

2012). Ce cycle circadien a également été observé en milieu naturel mais celui-ci s'avère relativement faible en comparaison du cycle circatidal alors observé (Tran *et al.*, 2011).

Qu'ils soient circadiens et/ou circatidaux, ces cycles endogènes sont considérés comme des adaptations permettant aux organismes d'anticiper les changements environnementaux et de s'adapter aux oscillations de ceux-ci (Ouyang *et al.*, 1998 ; Pittendrigh, 1993 ; Yerushalmi & Green, 2009).

Dans ce chapitre, les variations de l'activité sont mesurées au cours du temps après une exposition à un stress, qu'il soit de nature bactérienne et/ou thermique. Afin de pouvoir interpréter ces éventuelles variations, il faut s'assurer qu'elles sont bien la conséquence du stress spécifique auquel les animaux ont été soumis et non de paramètres incontrôlés. Pour les différentes expérimentations menées, plusieurs individus sont échantillonnés à chaque temps de prélèvement afin d'obtenir des valeurs moyennes qui permettront de lisser une éventuelle variabilité interindividuelle.

Si les échantillonnages sont réalisés à des moments différents de la journée, l'hypothèse peut être émise que d'éventuelles variations d'activités enzymatiques pourraient être le reflet d'un cycle endogène, ce qui biaiserait l'interprétation des résultats. C'est pourquoi une expérimentation préliminaire, mise en place et réalisée en collaboration avec Gaëlle Richard, a été menée dans le but d'explorer l'impact d'un cycle endogène potentiel, sur l'activité de 3 enzymes d'intérêt : la phénoloxydase, la superoxyde dismutase et la catalase. Les palourdes ont été acclimatées durant une semaine avant de débiter une expérimentation de 3 jours sur des animaux maintenus en conditions contrôlées et constantes (température, salinité, oxygène dissout). La concentration en monoxyde d'azote a également été dosée. Cette période d'acclimation d'une semaine est le minimum requis avant de pouvoir tester la rythmicité d'une quelconque activité (Kim *et al.*, 1999).

1. 2. Matériel et méthodes

1. 2. 1. Matériel biologique et acclimation

L'origine des animaux ainsi que l'acclimation de ceux-ci pendant une semaine avant le début de l'expérimentation sont détaillés dans le matériel et méthodes 2-1-3.

Pendant la totalité de l'acclimation et de l'expérience, la concentration en oxygène dissous, la température et la salinité ont été enregistrées grâce à une sonde YSI OMS 600 V2 immergée à la surface du bac (Figure 36). La salinité a également été mesurée tout au long de

l'expérimentation grâce à un réfractomètre. Une fois les animaux déposés à la surface du sédiment, ceux-ci se sont rapidement enfouis dans le sédiment et le bac a été recouvert par une bâche noire opaque afin de maintenir l'obscurité totale et d'éviter une quelconque influence de l'éclairage de la salle dans laquelle l'expérimentation s'est tenue. Les animaux ont ainsi été acclimatés pendant une semaine complète avant le début des expérimentations.



Figure 36. Dispositif expérimental mis en place pour la recherche d'un cycle endogène sur l'activité de 3 enzymes d'intérêt : la phénoloxydase, la superoxyde dismutase et la catalase chez la palourde japonaise. Les 2 systèmes de bullages sont disposés à chaque extrémité du bac et les arrivées en eau de mer filtrée sont réparties de façon homogène à la surface du bac. La sonde (YSI OMS 600 V2) est immergée à la surface du bac.

1. 2. 2. Prélèvements et préparation des échantillons

L'expérimentation s'est déroulée sur une période de 3 jours pleins, du mardi 5 février 2013 à 8h00 au vendredi 8 février à 8h00. Pendant toute la durée de l'expérimentation, 3 palourdes ont été prélevées toutes les 3 heures. Pour ce faire, la bâche était soulevée (alors que la lumière de la salle était réduite au minimum), les animaux, repérés grâce à leurs siphons qui affleurent la surface, étaient alors prélevés dans le sédiment à l'aide d'une pince.

Pour chaque animal échantillonné, l'hémolymphe et les branchies ont été prélevées comme indiqué dans la section 2 du chapitre 2.

1. 2. 3. Dosage des protéines

La concentration en protéines totales des échantillons de sérum d'hémolymphe et de surnageant de lysat de branchies a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) détaillée dans la partie Matériel et méthodes 2-3. Une gamme standard aux concentrations allant de 0,031 à 1mg.mL a été réalisée pour chaque dosage à partir

d'albumine de sérum bovin (BSA). Les concentrations en protéines totales ont permis de calculer les activités enzymatiques spécifiques.

1. 2. 4. Dosages enzymatiques

Sur chacun des échantillons l'activité PO a été mesurée selon la méthode détaillée dans la partie Matériel et méthodes 2-4 en utilisant la L-DOPA 0,04M comme substrat. Brièvement à 50µL de solution enzymatique (sérum d'hémolymphe ou surnageant de lysat de branchies) sont ajoutés 50µL de tampon Tris-HCl (0,1M ; pH8,2). Le milieu réactionnel est incubé 10 minutes à 25°C puis 100µL de L-DOPA sont ajoutés. L'absorbance est ensuite lue à 492 nm pour détecter la formation des produits d'oxydation de la L-DOPA. L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et l'activité de la catalase ont également été mesurées selon les protocoles détaillés dans le chapitre 2, sections 5.1. et 5.2. respectivement.

1. 2. 5. Analyses statistiques

La méthode statistique utilisée pour traiter les données est une PCNM (Principal coordinates of neighbour Matrices). Cette méthode est basée sur la décomposition spectrale de séries spatiales ou temporelles et a été mise au point par Borcart et Legendre (2002). Son principe est détaillé dans la partie Matériel et méthodes 2-11-1.

1. 3. Résultats

1. 3. 1. Paramètres environnementaux

En raison d'un brassage trop faible du volume d'eau dans le bac de l'expérimentation, la cellule de conductimétrie s'est rapidement encrassée c'est pourquoi les valeurs de salinité présentées et exploitées ne sont pas issues de la sonde YSI OMS 600 V2 mais sont issues des mesures effectuées avec le réfractomètre (Figure 37 A). On observe que ce paramètre est stable tout au long de l'expérimentation et qu'il est égal à 35‰. Les valeurs de température et d'oxygène dissous, quant à elles, montrent des variations faibles au cours du temps (Figure 37 B) comprises entre 10,13 et 10,83°C pour la température et entre 10,21 et 10,69mg.mL⁻¹ pour la teneur en oxygène dissout.

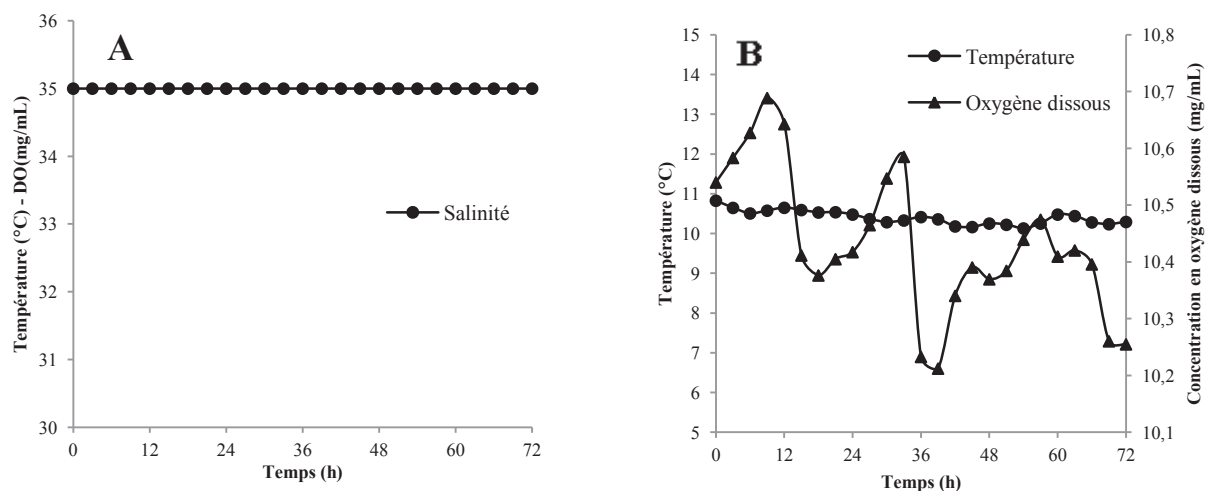


Figure 37. Evolution de la salinité (A), de la température et de la concentration en oxygène dissout (B) au cours des 72h de l'expérimentation.

1. 3. 2. Variations des activités enzymatiques

1. 3. 2. 1. Dans l'hémolymphe

Dans le sérum d'hémolymphe de chaque animal échantillonné, l'activité PO et l'activité SOD ont été dosées. Le premier constat est celui d'une variabilité interindividuelle importante pour chacune des 2 enzymes quel que soit le temps de prélèvement. Que ce soit pour l'activité PO (Figure 38 A) ou l'activité SOD (Figure 38 B) dans le sérum d'hémolymphe, aucune tendance nette n'est observable.

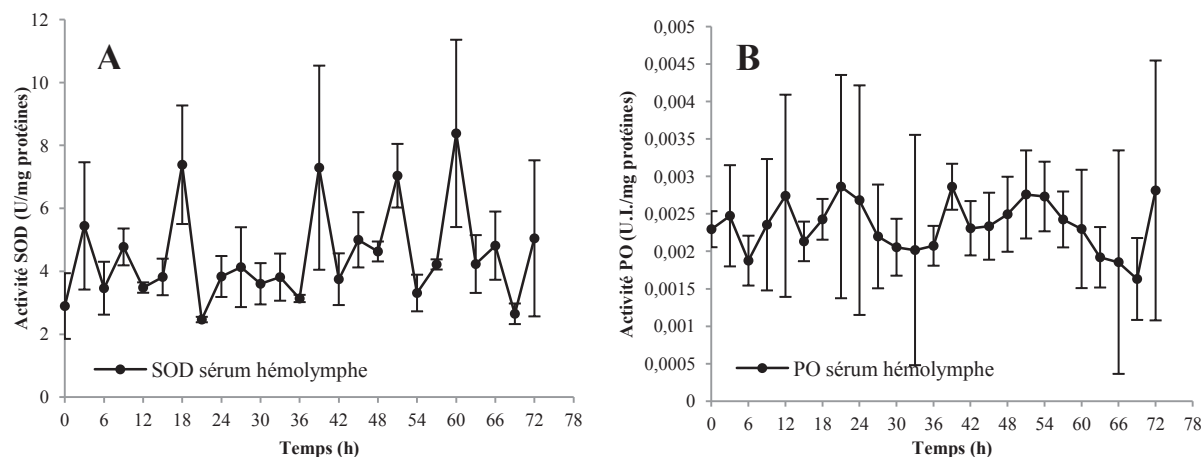


Figure 38. Evolution de l'activité SOD (A) et PO (B) dans le sérum d'hémolymphe en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm écart-type.

1. 3. 2. 2. Dans les branchies

Dans le surnageant de lysat de branchies de chaque animal échantillonné, l'activité PO, l'activité SOD et l'activité CAT ont été dosées. Par rapport aux résultats obtenus dans le sérum d'hémolymphe, l'activité PO dans le surnageant de lysat de branchies est plus faible pour les 3 enzymes étudiées, et la variabilité interindividuelle reste relativement élevée.

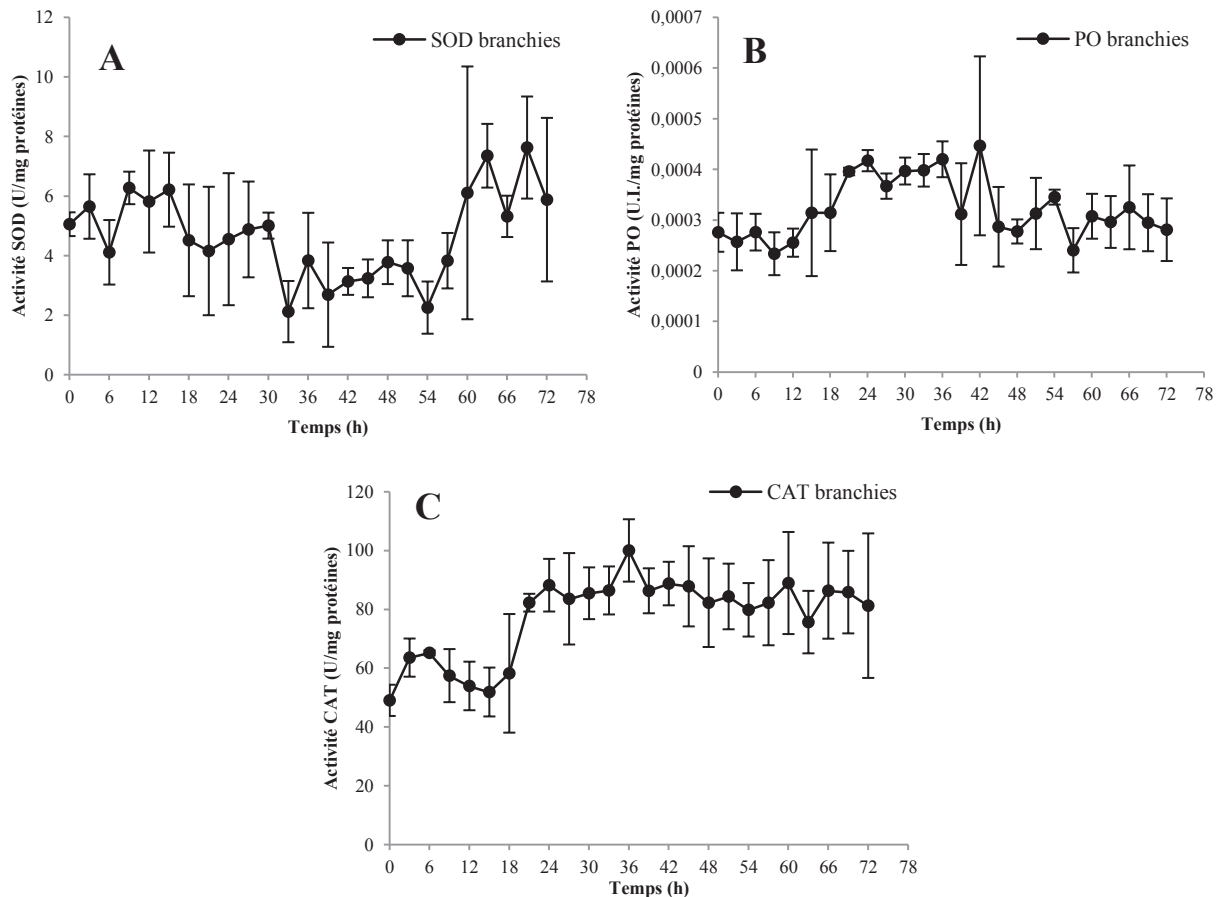


Figure 39. Evolution de l'activité spécifique SOD (A), PO (B) et CAT (C) dans le lysat de surnageant de branchies en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm écart-type.

1. 3. 3. PCNM

Avant de réaliser la PCNM, l'objectif est de rechercher d'éventuelles corrélations entre les variations des activités enzymatiques et celles des paramètres environnementaux. Ces tests de corrélation ne montrent aucune corrélation significative entre chacun des paramètres environnementaux et les activités enzymatiques, ce qui autorise l'exécution de la PCNM. Une matrice de distances est alors construite pour en extraire les vecteurs propres ayant des valeurs propres positives, c'est-à-dire montrant une auto-corrélation positive. D'un point de vue

biologique, ces vecteurs propres vont permettre d'expliquer les variations d'activités enzymatiques observées.

A partir des résultats de cette étude, il apparaît que 3 vecteurs sont significativement auto-corrélés positivement avec le temps ($p < 0,05$). Le premier de ces trois vecteurs est le facteur température et les deux autres sont des composantes temporelles. Une partition de la variation du modèle a ensuite été réalisée afin de déterminer la part du modèle expliquée respectivement par les données environnementales et par les données temporelles. Les résultats montrent que 6% de la variance du modèle sont expliqués par les données environnementales, 33% par les données temporelles, 2% par l'interaction des données environnementales et des données temporelles et 60% ne sont expliqués par aucune de ces données ni par leur interaction (Fig. 39).

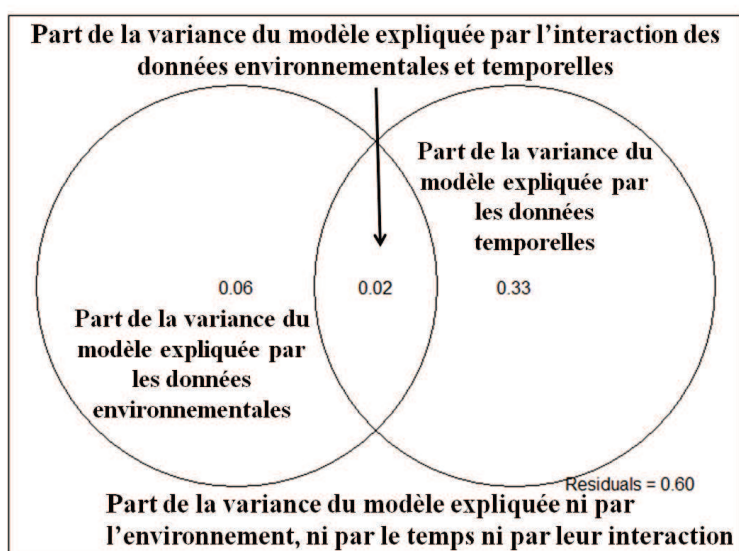


Figure 40. Représentation de la partition de la variance du modèle $Y = f(X, E)$ où Y est la matrice des variables réponses (i.e. les différentes activités enzymatiques) ; X est la matrice des vecteurs propres ayant des valeurs propres positives ; E est la matrice des variables environnementales.

Bien que le facteur température soit un vecteur significativement auto-corrélé positivement, les données environnementales n'expliquent qu'une part très faible du modèle (6%). La période associée au facteur température a néanmoins été étudiée et était égale à 26,4 heures ce qui n'a pas de signification d'un point de vue biologique. La part de la variance expliquée ni par les données environnementales, ni par les données temporelles ni par l'intersection de ces données est relativement importante (60%). Cette part importante de la variance peut notamment correspondre en partie au bruit de fond ou encore à la variabilité interindividuelle.

33% de la variance du modèle sont expliqués par les données temporelles. La période associée aux deux vecteurs auto-corrélés positivement reliés aux données temporelles a ensuite été établie. Ces deux périodes nous ont donné la structuration temporelle des activités enzymatiques. Le premier de ces deux vecteurs était associé à une période de 54 heures et le second à une période de 38h heures. Aucune de ces deux périodes n'a de sens d'un point de vue biologique car aucune de ces périodes ne traduit un rythme circadien et/ou circatidal.

1. 4. Discussion

Chez les invertébrés marins, différentes rythmicités ont pu être observées, au niveau du système immunitaire, à différentes échelles de temps. Le plus souvent, ce sont le nombre d'hémocytes et leur activité qui sont étudiés. Ainsi, chez *Crassostrea virginica*, les hémocytes montrent une activité antibactérienne contre *Vibrio parahaemolyticus* and *Lysteria monocytogenes* plus importante en été qu'en hiver (Genthner *et al.*, 1999). Des variations saisonnières du contenu protéique, des activités enzymatiques des hémocytes ou du lysozyme ont ainsi été observées chez différentes espèces de moules et d'huîtres (Chu & La Peyre, 1989 ; Santarem *et al.*, 1994 ; Carballal *et al.*, 1998). Cependant, ces variations saisonnières ne sont pas endogènes aux organismes mais liées aux variations des paramètres environnementaux et, plus particulièrement, aux variations du facteur température. Qu'ils soient circadiens ou circatidaux, des cycles endogènes ont été mis en avant chez *C. gigas* (Tran *et al.*, 2011 ; Mat *et al.*, 2012) ou encore chez *V. philippinarum*. Toutefois, ces cycles n'étaient pas directement liés au système immunitaire des animaux puisqu'ils concernaient l'ouverture des valves ou la consommation en dioxygène. L'objectif de cette étude était de s'assurer que l'interprétation de variations d'activités enzymatiques, chez *V. philippinarum*, ne serait pas biaisée par l'existence de cycles endogènes susceptibles de moduler ces activités enzymatiques.

Les résultats obtenus montrent en effet que les données environnementales, et plus précisément la température de l'eau, explique en partie les variations observées au niveau des activités des enzymes étudiées. Ce rôle majeur de la température peut, en laboratoire, être maîtrisé puisque la température de l'eau utilisée, pour les différentes expérimentations, est suivie et au besoin contrôlée.

Ainsi, une grande partie de la variance observée ne peut être expliquée ni par les données environnementales, ni par les données temporelles, ni par l'intersection des différentes données. Cette part importante du modèle inexpliquée par les données peut en partie être expliquée par la variabilité interindividuelle relativement importante observée pour les différentes enzymes étudiées. La variabilité interindividuelle évoquée ici, mais aussi la

variabilité intraindividuelle, ont déjà été estimée pour différents paramètres immunitaires chez la palourde japonaise (Ford et Paillard, 2007). Cette variabilité peut néanmoins être réduite en augmentant le nombre d'individus échantillonnés à chaque temps de prélèvement. En effet, pour cette expérimentation, en raison de la fréquence des dosages effectués seulement trois individus étaient prélevés par temps de prélèvement, ce qui est relativement faible, d'autant plus que l'expérimentation a été réalisée dans un seul bac. Les expérimentations suivantes, traitant de réponses enzymatiques, devront être menées dans différents bacs (réplicas) et davantage d'individus devront être échantillonnés par temps de prélèvement afin de réduire la variabilité interindividuelle.

Au cours de cette expérience, seuls 33% du modèle sont expliqués par les données temporelles, ce qui est relativement faible et insuffisant pour en déduire l'existence de cycles endogènes au niveau enzymatique de *V. philippinarum* dans les conditions expérimentales fixées. De plus, les deux périodes mises en avant dans cette faible part de la variance du modèle sont égales à 54 et 26,4 heures. La période de 54 heures a été établie sur une durée d'expérimentation de 72 heures ce qui signifie que ce « cycle », s'il existe réellement, n'a pas pu être répété au cours de l'expérience. Aussi, pour confirmer ce résultat il serait préférable de réitérer l'expérience sur une durée plus longue.

Les paramètres mesurés au cours de cette expérimentation, à savoir les activités enzymatiques, nécessitaient l'utilisation d'une méthode destructive contrairement aux méthodes utilisés pour mesurées, par exemple la consommation d'oxygène ou l'ouverture des valves. L'utilisation d'une telle méthode destructive implique le prélèvement de plusieurs individus or une hypothèse ne doit pas être négligée. Les individus prélevés présentaient, peut être un cycle endogène au niveau des activités enzymatiques mais les individus peuvent présenter une désynchronisation entre eux qui ne ferait alors qu'augmenter la variabilité interindividuelle tout en dissimulant une quelconque cyclicité des activités enzymatiques. Il est cependant extrêmement difficile, pour de tels dosages, dans les compartiments étudiés de ne pas faire appel à des méthodes destructrices.

1. 5. Conclusions

Des cycles saisonniers ont déjà été décrits chez la palourde japonaise au niveau des paramètres immunitaires tels que le nombre d'hémocytes ou encore l'indice de condition. Ces cycles sont principalement saisonniers et sous le contrôle d'un facteur principal : la température. A ce jour, aucun cycle endogène n'a été mis en avant chez *V. philippinarum* au

niveau des enzymes impliquées dans le système immunitaire. Les résultats de cette étude abondent dans ce sens puisqu'aucun cycle endogène significatif n'a pu être démontré au niveau de l'activité de la PO, de la SOD ou de la CAT. Ainsi, pour la suite des expérimentations, d'éventuelles variations de ces différentes activités pourront être interprétées comme des réponses face aux variations de l'environnement biotique et/ou abiotique de l'individu et non comme variations « naturelles » des activités enzymatiques, endogène à l'animal.

2. Etude des activités phénoloxydase et superoxyde dismutase chez Venerupis philippinarum infectée par Vibrio tapetis

Le système enzymatique PO est considéré comme un élément clé du système immunitaire des invertébrés notamment par son implication dans la synthèse de la mélanine et de ses dérivés qui possèdent des propriétés bactéricides, fongicides et antivirales (Cerenius & Söderhäll, 2008). Chez *V. philippinarum*, confrontée à la Maladie de l'Anneau Brun (MAB), l'action de ce système enzymatique est directement observable à travers les dépôts bruns de conchioline qui enrobent les bactéries lorsque celle-ci viennent se fixer à la lame périostracale des palourdes (Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard & Maes, 1995a, b ; Trinkler *et al.*, 2010). La conchioline est en effet un dérivé de la mélanine et sa synthèse résulte donc de l'activation de la cascade PO (Paillard, 2004a). Cependant, la réponse du système enzymatique à une infection bactérienne, et particulièrement face au développement de la MAB n'a, à ce jour, pas été étudiée. Cette étude porte donc sur la réponse du système PO de *V. philippinarum*, à une infection par *V. tapetis*. Afin de compléter la compréhension de cette réponse immunitaire, une autre enzyme du système immunitaire a été étudiée dans les mêmes conditions : la superoxyde dismutase (E.C. 1.15.1.1) (SOD). Le rôle de la PO, dans le système immunitaire a préalablement été défini et la seconde enzyme étudiée est, tout comme la PO une oxydoréductase mais celle-ci intervient dans l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (EROs). Celles-ci sont produites par l'organisme pour se défendre contre l'entrée d'organismes étrangers ou, de façon plus générale, pour lutter contre l'invasion de particules considérées comme faisant partie du non-soi (Hermes-Lima, 2004). Les espèces radicalaires produites possèdent des propriétés antimicrobiennes les impliquant directement dans la défense immunitaire (Fang, 2004). La fonction principale de la SOD est donc de réguler la production de ces EROs afin que celle-ci soit suffisante pour participer à la défense de l'organisme sans que les EROs ne soient produites en trop grande quantité pour éviter qu'elles ne nuisent à l'homéostasie de l'animal (Hermes-Lima, 2004).

Dans cette étude, les deux enzymes PO et SOD, sont donc utilisées comme des biomarqueurs du système immunitaire de la palourde exposée à *V. tapetis*. Afin d'estimer l'effet de la pathogénicité sur la réponse enzymatique, deux souches bactériennes de *V. tapetis* ont été sélectionnées pour cette expérimentation : CECT4600, qui est, à ce jour, considérée comme la souche la plus virulente pour *V. philippinarum* (Choquet *et al.*, 2003) et LP2 qui a été isolée chez une espèce de crénilabre et qui est considérée comme faiblement pathogène pour *V. philippinarum*. Afin de ne pas négliger l'effet de l'injection en elle-même, des animaux

contrôles ont reçu une injection d'eau de mer stérile filtrée. Les activités enzymatiques seront suivies pendant 30 jours après les infections dans l'hémolymphe, les fluides extrapalléaux et dans le manteau des animaux afin de voir s'il existe une réponse tissu-dépendante de la part de ces enzymes notamment en fonction de la proximité avec le site d'infection. Ces infections ont été réalisées, pour la première fois, dans la cavité extrapalléale périphérique des animaux afin de mimer le fait qu'une fois fixé à la lame périostracale, le *Vibrio* peut pénétrer dans cette cavité avant de pénétrer dans la cavité extrapalléale centrale qui, chez des animaux sains, reste stérile (Allam *et al.*, 2000a).

L'interaction caractérisant la MAB n'est pas seulement une interaction entre un hôte et un organisme pathogène mais davantage une interaction tripartite impliquant la palourde, la bactérie pathogène mais aussi l'environnement. Parmi les paramètres environnementaux ayant un impact sur le développement de la MAB, la température est celui dont les effets semblent les plus significatifs. En effet la température impacte directement les capacités de défense de l'hôte (Paillard *et al.*, 2004), les capacités de développement de la bactérie au sein de la palourde (Maes, 1992 ; Paillard *et al.*, 1997) et donc impacte directement le développement de la maladie. Aussi, la seconde partie de cette étude reprend le même protocole expérimental mais à deux températures différentes. Pour cette seconde partie, les activités enzymatiques ont été suivies pendant 30 jours dans l'hémolymphe et le manteau des organismes et l'état d'avancement de la MAB ainsi que les capacités de réparation des organismes ont été évalués 30 jours après les infections. Cette seconde partie de l'étude a donc pour objectif la compréhension de l'influence de l'environnement, et particulièrement du facteur température sur l'interaction entre *V. philippinarum* et *V. tapetis*.

Article 3. Enzymatic activities associated with *Vibrio tapetis* infection in the manila clam, *Venerupis philippinarum*

Article 4. Combined effect of temperature and virulence of two *Vibrio tapetis* strains on phenoloxidase and superoxide dismutase activities during disease development in the manila clam, *Venerupis philippinarum*

Enzymatic activities associated with *Vibrio tapetis* infection in the manila clam, *Venerupis philippinarum*

Cédric Le Bris¹, Gaëlle Richard¹, Christine Paillard¹, Christophe Lambert¹, Catherine Segueineau², Olivier Gauthier¹, Fabrice Pernet², Fabienne Guérard¹.

1 : UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER, LEMAR – IUEM – UBO, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise – Rue Dumont d’Urville, 29280 Plouzané, France.

2 : UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER, LEMAR – IUEM – UBO, Ifremer, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Technopôle Brest-Iroise BP 70 29280, Plouzané, France

Abstract

Manila clams, *Venerupis philippinarum* (Adams and Reeve, 1850), were experimentally challenged with two *Vibrio tapetis* strains, CECT4600 the causative agent of Brown Ring Disease (BRD) and LP2 supposed to be non-pathogenic to *V. philippinarum*. Changes in phenoloxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD), two major enzymes involved in immunity, were studied for 30 days after infections in two tissues, the mantle and hemolymph. Bacterial infection in *V. philippinarum* resulted in modulation of PO and SOD activities that was tissue- and time-dependent. A response in early times was detected in the mantle associated with significant increase of PO and SOD activities in LP2- and CECT4600-challenged clams 36h post injection. This first response in the mantle could be explained by the proximity with injection region (extrapallial cavity). In hemolymph, the response occurred in later times and was associated with an increase of PO activity and a decrease of SOD activity. As hemolymph is a circulating fluid, this response delay could be due to an “integration time” needed by organism to counteract the infection. Injections also impacted PO and SOD activities in both tissues and confirmed the difference of pathogenicity between the two *V. tapetis* strains.

Keywords: *Venerupis philippinarum*; *Vibrio tapetis*; Brown Ring Disease; Immunity; Phenoloxidase; Superoxide Dismutase;

1. Introduction

The manila clam, *Venerupis philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) was introduced, in France from US, in 1972 because of its faster growth than that of the European clam *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) [1]. Since 1987, the species is subject to the brown ring disease (BRD) caused by the pathogenic gram-negative bacterium *Vibrio tapetis* [2]. BRD is characterized by the formation of a brown deposit of conchiolin at the edge of the mantle, on the inner shell of the clam [3]. In fact, during the disease development, the bacterium first colonizes the periostracal lamina, then, in some conditions (lesions, starvation, ...) tissues and finally the circulatory system, leading to a systemic infection and to the organism's death. The effects of BRD on manila clams have been reviewed by Paillard [4]. BRD has decimated clam populations, first in Brittany (France) before spreading along French and European coasts [3]. Since the isolation of the pathogenic bacterium (*V. tapetis* CECT4600) in the manila clam in 1990 in Landeda (Brittany, France ; Paillard & Maes, 1990 ; Borrego *et al.*, 1996), around 40 different *V. tapetis* strains have been isolated in various mollusks and fishes in France [5], England [6, 7], Spain [8], Norway [9], Scotland [7] and Japan [10]. Pathogenicity of most of these strains was studied and *V. tapetis* CECT4600 seems to be the most pathogenic strain to *V. philippinarum* [11]. To counter mortalities caused by BRD it is important to understand action mechanisms of the pathogenic bacteria and also to understand the host immune system operation. Many studies have been done about the clam immune response during bacterial infection of *V. philippinarum* and it has been shown that the occurrence of *V. tapetis* in the clam hemolymph leads to a loss of hemocyte adhesion capacities because these cells become rounded and lose their filopods [11] and to a decrease in size and complexity of granulocytes [12]. More recently it was demonstrated that *V. tapetis* occurrence in the clam hemolymph significantly increases the nitric oxide production in a dose-dependent way [13]. Most of the studies on *V. philippinarum* immune response to *V. tapetis* infection focused on the cellular immunity, mainly represented by hemocytes [6, 14-18]. However, invertebrate immunity can be divided into cellular and humoral immune response [19, 20]. The humoral immunity includes various enzymes such as lysozymal enzymes and antioxidant enzymes, but also antimicrobial peptides, cytotoxic and antiviral molecules [20-23]. Hence, the host immunity, and its potential defense capability against pathogen agents, could also be investigated through the nature and activity of endogenous enzymes [24, 25]. Phenoloxidase (PO), which is one of these humoral immune enzymes, plays monitored because of its key role in invertebrate immune system and especially in the

activation of the melanization cascade [26]. In fact POs (E.C. 1.14.18.1, E.C. 1.10.3.1 and E.C. 1.10.3.2) oxidize phenolic compounds into corresponding quinones and then into melanin and its derivatives [27, 28] which have fungistatic, bacteriostatic and antiviral properties [29]. For example, in the oyster, *Saccostrea glomerata*, a negative correlation was found between PO activity level and the level of infection by the pathogen *Marteilia sydneyi* which is responsible of QX disease [30]. More precisely, a QX resistance breeding program has been developed along Australian east coast and this program has selected oysters with enhanced PO activities [31]. PO activity in *V. philippinarum* hemolymph was biochemically characterized [32, 33] but its variations after infection has, to date, never been followed. As PO, superoxide dismutase (SOD) (E.C. 1.15.1.1) is an oxidoreductase, taking part in innate immunity by preventing Reactive Oxygen Species (ROS), particularly superoxide anion (O_2^-), accumulation in the organism. ROS generation occurs spontaneously during respiration, starting with molecular oxygen reduction (dismutation) into O_2^- [34]. In marine bivalves, ROS are generated in larger proportions as the organism is exposed to biotic challenges such as *Vibrio* extracellular products [35, 36]. ROS are known to exhibit antimicrobial properties but overconcentrations could lead to cellular damages: it is the antioxidant paradox [37, 38]. In order to control the cell redox status, antioxidant enzymes are recruited to diminish ROS concentration. In this enzyme system, SuperOxide Dismutase (SOD) reduces superoxide anion into a less reactive oxygen species, hydrogen peroxide (H_2O_2) [39]. Intracellular SOD gene expression analyses were performed in manila clams infected with *Vibrio species* (*V. anguillarum*, *V. tapetis*) and showed time-dependent variations over short periods (96 hours maximum) [40, 41]. Nevertheless, SOD has not been studied biochemically in *Vibrio*-challenged clams yet. Thus, it is interesting to focus on biological activities of PO and SOD, on longer periods (up to 30 days after injection) since BRD symptoms require time to develop after infection.

Thus, the aim of this study was to investigate the effects of an infection with *V. tapetis* on enzymatic activities in *V. philippinarum*. More precisely, clams were infected with two different *V. tapetis* strains and their PO and SOD activities were monitored and analyzed for 30 days after the infections. More exactly, the aim of our study was to compare the immune response, in different compartments, through PO and SOD activities, of clams injected with two different *V. tapetis* strains, considered more or less virulent, or with Sterile Sea Water (SSW).

2. Materials and methods

2. 1. Biological material and acclimation procedure

Around 600 adult *V. philippinarum*, $39.80 \text{ mm} \pm 2.60$ (SD) long were collected in Ile Tudy, South Finistère, by SATMAR (Aquaculture Company) on October 2012 and transferred to the laboratory. These clams were divided into 9 aerated 75L-tanks at $15.3 \pm 0.6^\circ\text{C}$ and acclimated for one week before the injections. The 9 tanks correspond to the three conditions (Two *V. tapetis* strains and one control) made in triplicates.

2. 2. Bacterial strains

For the bacterial challenge experiments, two *V. tapetis* strains were used: *V. tapetis* CECT4600 (also known as CIP 104856) which was isolated from diseased *V. philippinarum* in 1990 in Brittany, France [42, 43]; LP2, isolated from the fish *Symphodus melops* in 1999 in Norway [9] and less pathogenic to *V. philippinarum* after *in vivo* pallial cavity inoculation or after *in vitro* biotests [11, 44]. These strains were grown in Zobell's medium overnight at 18°C and bacterial solution concentrations were determined by spectrophotometry at 490 nm ($[C] = \text{O.D.} \times 1.3 \times 10^9 - 3.6 \times 10^7$).

2. 3. Experimental injections

Twelve hours before injections, animals were removed from their tank and replace in 15°C sea water just before the injections to facilitate their opening. Experimental infections were carried out by injecting 100 μL of *V. tapetis* suspension (10^6 CFU.mL^{-1}) per individual in the extrapallial cavity with sterile needles (25G $0.5 \times 16 \text{ mm}$) fitted onto 1mL sterile syringes. The needle was introduced in the extrapallial cavity under the mantle. Control clams were inoculated, in the same manner, with 100 μL of sterile sea water (SSW) in the extrapallial cavity. After the injections, animals were maintained for 6 hours out of sea water. Then animal were replaced into their aerated tanks.

2. 4. Fluid and tissue collection

Five individuals were sampled in each tank (3 tanks per condition so 15 individuals sampled per condition) before the injections corresponding to time T0. Then, 5 animals were collected, in each tank, at different time intervals: 36 hours, 72 hours, 7 days, 14 days and 30 days post-injection (p.i.).

2. 4. 1. Hemolymph and extrapallial fluid collection

Hemolymph of each sampled clam was withdrawn from the posterior muscle, through the hinge, using sterile needles (25G 0.5× 16 mm) fitted onto 1mL sterile syringes. The hemolymph collected was then centrifuged at 785g for 10 minutes at 4°C, to separate the hemocytes from the serum. The resulting serum was stored at -80°C until enzymatic and protein assays. After hemolymph collection, the Extrapallial Fluid (EF) was collected, in each valve, by opening the valves and inserting a second sterile needle (25G 0.5 × 16 mm), fitted on a sterile syringe, between the mantle and shell in the sinusal and central compartment. The EF was then centrifuged at 785g for 10 minutes at 4°C to separate the cellular fraction and the acellular fraction (serum). This serum was stored at -80°C until enzymatic and protein assays.

2. 4. 2. Tissue collection and protein extraction

Both right and left mantle were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C until powdered by grinding with liquid nitrogen in a Retsch MM 400 blender. The powder obtained was stored at -80°C. Before use, samples were resuspended in 500µL of lysis buffer [45, 46]. The resuspended powder was then homogenized using Ultra-Turrax (Modele PRO 200) and centrifugated at 10 000g for 45 minutes at 4°C. Enzymatic and protein assays were done on the resulting supernatant.

2. 5. Protein determination

The total protein content of *V. philippinarum* serum, extrapallial fluid and mantle lysate supernatant was determined by the Bradford method [47] using BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad France) and bovine serum albumin (BSA) as the protein standard.

2. 6. Enzyme activity assays

2. 6. 1. Phenoloxidase assays

PO activity was assayed spectrophotometrically in 96-well microplates (Greiner 96-F-bottom), by recording the formation of quinones according to the protocol of Le Bris *et al.* [33]. Briefly, 50µL of Tris-HCl buffer (0.10M, pH 8.0) were added to 50µL of enzymatic solution (Hemolymph and EF serum and grinded mantle supernatant). This mixture was incubated for 10 minutes at 25°C, then, 100µL 0.04M L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) were added to each well. L-DOPA is the most commonly used PO substrate and is common to the three PO subclasses. The microplate was quickly mixed and placed in the microplate spectrophotometer (POLARstar Omega – BMG Labtech) to measure absorbance

(A) at 25°C immediately after the substrate was added. PO activity was then monitored for 30 minutes following the increase of absorbance at 492nm which is the wavelength at which L-DOPA oxidized products absorb. At the same time, the spontaneous oxidation of L-DOPA was measured by replacing enzymatic solution with pure water in blank runs, and the values thus obtained were subtracted from the test values. The PO specific activities were expressed in international unit (U.I.) per milligram of total protein.

PO specific activity (U.I.mg protein⁻¹) = ($\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \times \text{dilution factor}$) / Total protein concentration

2. 6. 2. Superoxide dismutase assays

Total superoxide dismutase (SOD: EC 1.15.1.1) activity was assayed spectrophotometrically in 96-well microplates (Greiner 96-F-bottom) by an indirect method based on competition of SOD with Water Soluble Tetrazolium salt (WST-1) for reduction of O₂⁻. Briefly, 20μL of sample solution and 200μL of WST-1 solution were added to each well and gently mixed. The reaction was initiated by adding 20μL of xanthine oxydase (XO) and xanthine mix (enzyme solution) to each well, thus forming superoxide anion used by SOD and WST-1 (SOD Assay kit, SIGMA ALDRICH). Two blanks were performed, one by replacing sample solution with milliQ-water (background reduction of O₂⁻), the other one by replacing sample solution with milliQ-water and enzyme solution with dilution buffer (blank without reaction). The reduction of WST-1 by O₂⁻ produces a yellowish formazan dye which absorbance can be read at 450nm, after incubation (25°C for 20 min), with POLARstar Omega microplate reader (BMG LABTECH). As the rate of reduction of WST-1 by O₂⁻ is linearly related to XO activity and is inhibited by SOD, SOD activity is calculated as an inhibition activity of this reaction. Subsequently, a standard inhibition curve was performed using SOD from bovine erythrocytes (SIGMA ALDRICH). SOD activities were expressed in units per mg of protein (U/mg); 1 U of SOD being defined as the amount of enzyme inhibiting by 50% the reaction.

2. 7. Statistical analysis

Correlation analysis between specific activities (PO and SOD) and protein contents were performed in order to assess the relation between those two variables. As we are interested in highlighting every monotone relation (decreasing or increasing) and not only a linear relation, we used the Spearman test.

Two-way split-plot analyses of variance (ANOVA) were conducted to determine differences in PO, SOD and protein contents according to the Injection Condition (fixed effect with three levels: SSW, LP2 and CECT4600), Time p.i. (fixed effect with six levels: T0, 36 and 72

hours, 7, 14 and 30 days p.i.) and their interaction Injection X Time p.i. The unit of replication was the tank in which injected clams in the same injection condition were placed (n=3 tanks for each injection condition). The main plots were injection levels (SSW, LP2 and CECT4600), subplots were sampling times (time p.i.). Three-way split-split-plot ANOVAs were used to determine differences in PO, SOD and protein contents upon injection condition, time p.i. and tissue. Characteristics of this three-way split-split-plot were similar to those of the two-way split-plot analysis except that sub-subplots were performed using tissue levels (hemolymph, EFs and mantle). The model used for these analyses was the linear model using the aov function of R that fits an ANOVA model. Where significant differences were obtained, a post-hoc analysis was done using Tukey test to determine which means were significantly different for main effects and interaction effects. Normality and homoscedasticity of residuals were assessed by graphical methods. When necessary, explained variables were transformed using the log(x+1) transformation in order to satisfy the normality and homoscedasticity assumptions.

All analyses were performed with R (version 2.15.3; [48]) using “TuKeyC” package [49].

3. Results

3. 1. Enzyme activities correlations with protein contents

Prior to further investigation, enzyme specific activities were plotted as function of protein content (Fig.1A-D). These representations demonstrate particular correlations between specific activities and protein contents. In mantle, PO specific activities (I.U.mg^{-1}) (Fig.1A) are negatively correlated to protein content ($\rho = -0.98$, p-value $< 2.2\text{e-}16$). In hemolymph, PO and SOD specific activities (U.mg^{-1}) (Fig.1B and D) are both negatively correlated to protein (respectively for PO and SOD, $\rho = -0.52$, p-value $< 2.2\text{e-}16$ and $\rho = -0.29$, p-value = $1.248\text{e-}09$). Yet, specific data do not truly represent PO and SOD activities as they superficially lower them while protein content rises. Thus, PO volumic activities (I.U.mL^{-1}) in mantle and hemolymph, SOD volumic activities (U.mL^{-1}) in hemolymph were preferentially used.

Conversely, in mantle, SOD specific activities (Fig.1.C) are positively correlated to protein contents ($\rho = 0.43$, $p\text{-value} < 2.2e-16$). This correlation permits then to use directly SOD specific activity in mantle. These results indicate that the widely used specific activities are not always relevant, and this depends on the considered tissue and enzyme.

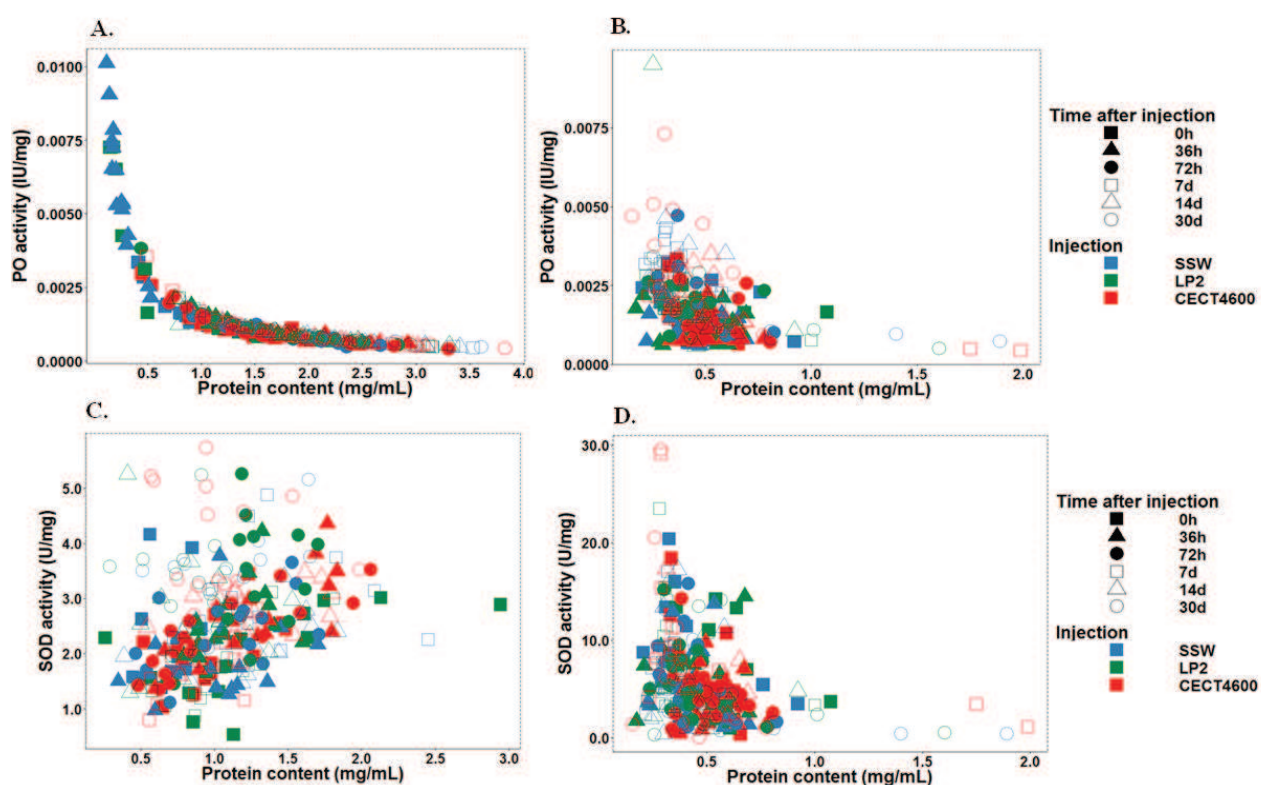


Fig. 1. Protein content correlation with PO specific activity and SOD specific activity respectively in the mantle (A. and C.), and in hemolymph (B. and D.)

3. 2. Protein contents and enzymatic activities

3. 2. 1. Protein contents

Protein contents varied as a function of injection \times tissue \times time interaction ($F=5.209$, $p=2.19 \times 10^{-8}$).

In the mantle, a significant time and injection interaction ($F=5.8$, $p=5.6 \times 10^{-5}$) affects protein contents as they increase in CECT4600- and LP2-challenged clams 36 hours p.i. (Fig.2A). In hemolymph, there was no significant time and injection interaction ($F=1.98$, $p=0.072$) but protein contents were higher in LP2-challenged and control clams 30 days p.i. (Fig.2B). In extrapallial fluids, there was no significant interaction effect but significant first order effects of time ($F=11.03$, $p=4.3 \times 10^{-6}$) and injection ($F=9.82$, $p=0.012$) occurred (Fig.2C).

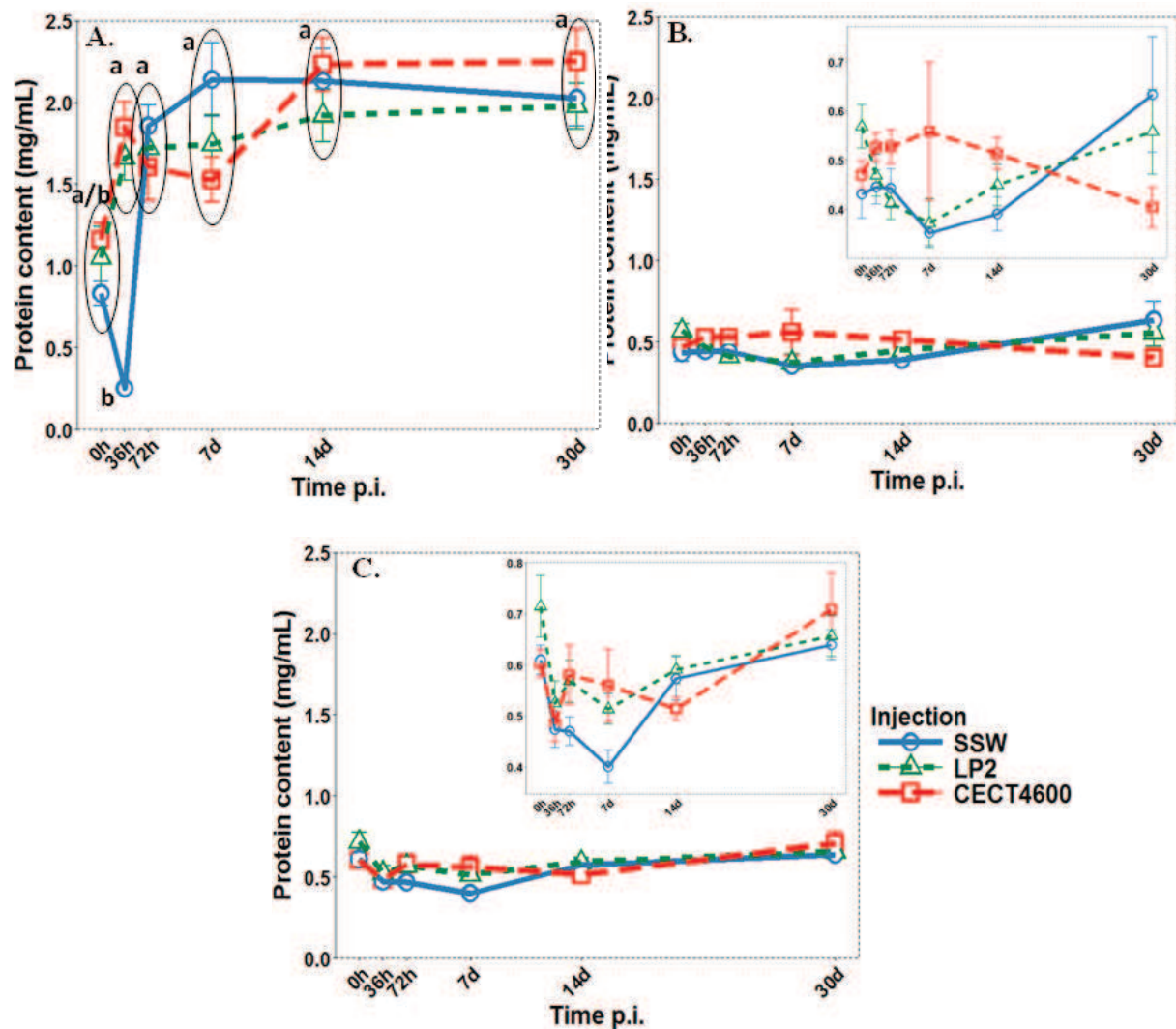


Fig. 2. Protein contents in the mantle (A), hemolymph (B) and extrapallial fluids (C) of *V. philippinarum* post-injection (p.i.) with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater (SSW). Error bars represent standard error. Letters indicate significant differences in protein contents upon injection and time between groups (Split-plot ANOVA followed by post hoc Tukey HSD test, $\alpha = 0.05$). N = 15 per group.

3. 2. 2. PO activities

PO activities also varied as a function of time \times injection \times tissue interaction ($F=3.279$, $p=6.05 \times 10^{-5}$).

In the mantle, PO is influenced by a significant time and injection interaction ($F=2.96$, $p=0.01$). Thirty six hours p.i., PO activity increases in CECT4600- and LP2-challenged clams. Additionally, three days p.i., PO activity is higher in LP2-challenged clams than in CECT4600-challenged and control clams (Fig.3.A). In hemolymph, PO activities are lower in CECT4600- and LP2-challenged clams 7 days p.i. in comparison with control clams and are increased in CECT4600-challenged clams 30 days p.i. (Significant time and injection interaction, $F=2.87$, $p=0.012$) (Fig.3B).

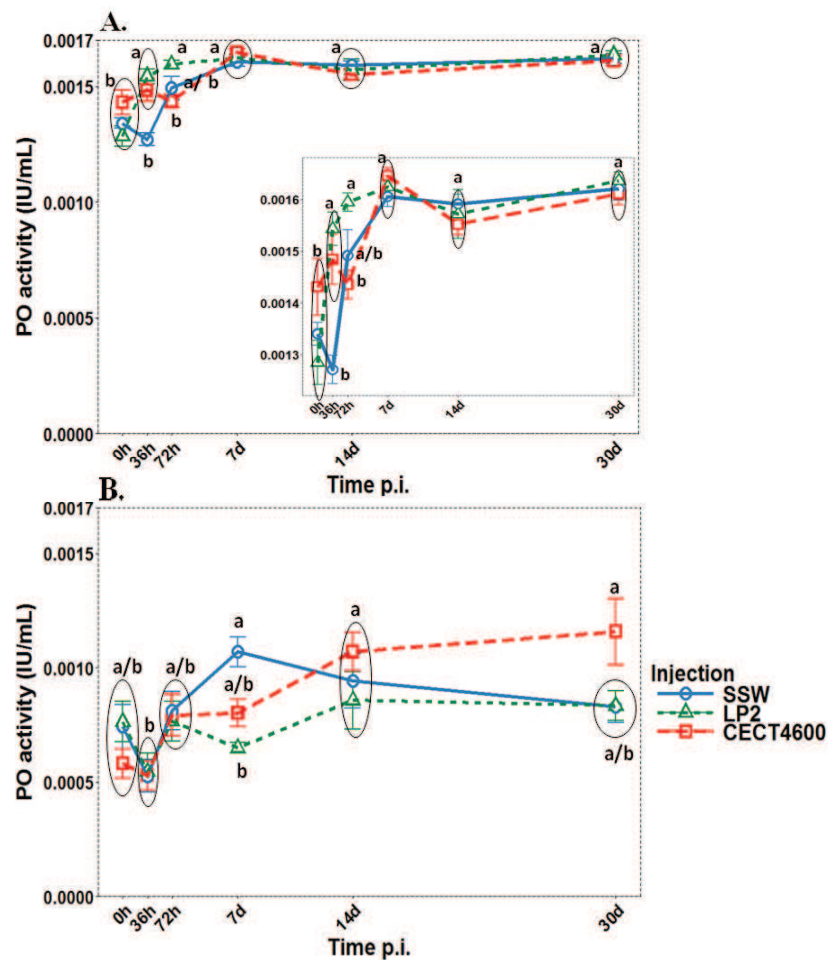


Fig. 3. PO activities in the mantle (A) and hemolymph (B) of *V. philippinarum* post-injection (p.i.) with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater (SSW). Error bars represent standard error. Letters indicate significant differences in PO activity upon injection and time between groups (Split-plot ANOVA followed by post hoc Tukey HSD test, $\alpha = 0.05$). N = 15 per group.

3. 2. 3. SOD activities

SOD activities varied as a function of time \times injection \times tissue interaction ($F=2.584$, $p=0.011$).

In the mantle, SOD activity increases in CECT4600 and LP2-challenged clams 36 hours p.i. and in contrary, drops in the same clams 7 days p.i. (Fig.4A) (significant time and injection interaction, $F=3.76$, $p=0.002$). In hemolymph, no significant effect was observed but a rise in SOD activity occurs in CECT4600-challenged clams 7 days p.i. (Fig.4A).

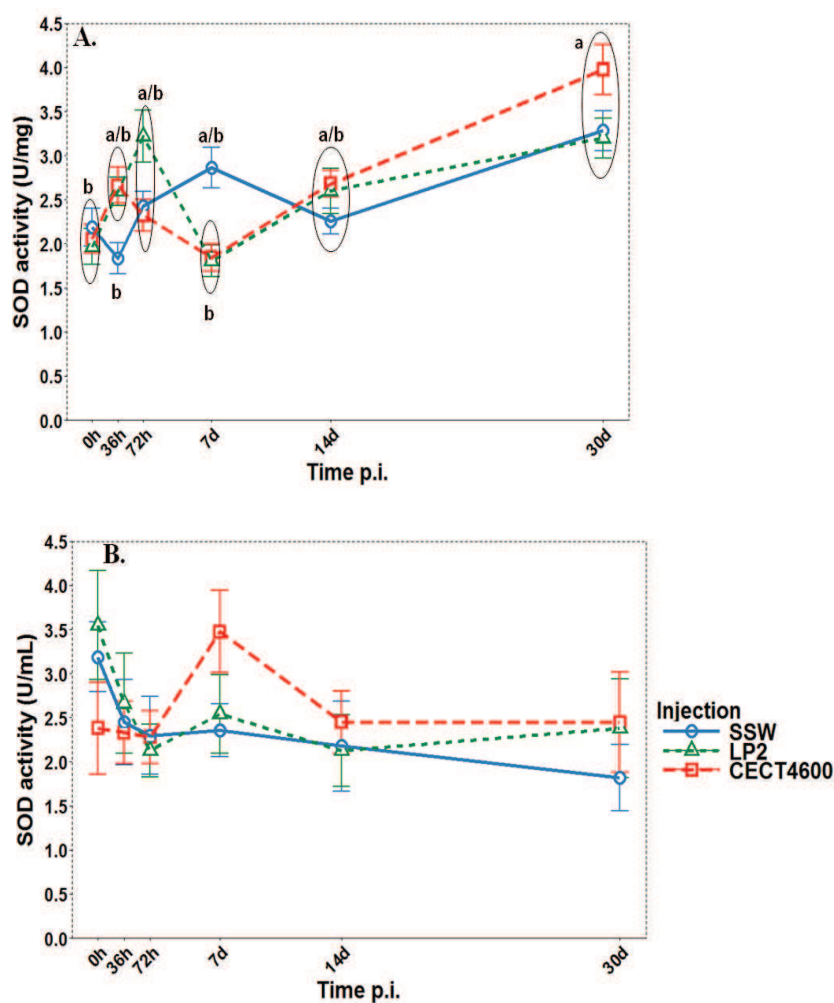


Fig. 4. SOD activities in the mantle (A) and hemolymph (B) of *V. philippinarum* post-injection (p.i.) with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Sea Water (SSW). Error bars represent standard error. Different letters indicate significant differences in SOD activity upon injection and time between groups (Split-plot ANOVA followed by post hoc Tukey HSD test, $\alpha = 0.05$). N = 15 per group.

Table 1. Summary of the split plot two-way ANOVAs on the effect of injection condition and time p.i. on protein contents, PO and SOD activities in mantle of *V. philippinarum*

Source of variation	d.f.	Protein contents		PO activity		SOD activity	
		F	p	F	p	F	p
Main plot analysis							
Injection	2	15,7	0,00413	0,377	0,323	2,607	0,153
Error (tank)	6						
Subplot analysis							
tissu	2	1601,553	2,70E-15	268,97	1,08E-10	7,649	3,26E-02
traitement × tissu	4	4,934	1,38E-02	2,015	0,156	0,063	0,9397
Error (bac × traitement × tissu)	12						
Sub-subplot analysis							
temps	5	13,005	1,59E-09	12,266	4,47E-09	0,242	0,9421
traitement × temps	10	4,276	6,98E-05	1,804	0,0711	1,821	0,076151
tissu × temps	10	12,707	1,65E-13	10,248	2,56E-11	5,591	0,000271
traitement × tissu × temps	20	5,209	2,19E-08	3,279	6,05E-05	2,584	0,011283
Error (bac × traitement × tissu × temps)	90						

Independent variables were injection condition (SSW, CECT4600 and LP2) and time p.i. (0h, 36h, 72h, 7d, 14d and 30d). Significant probabilities are in bold. All data were (log+1) transformed.

Table 2. Summary of the split-split plot three-way ANOVAs on the effect of injection condition, tissue sampled and time p.i. on protein contents, PO and SOD activities in hemolymph of *V. philippinarum*

hemolymph of <i>V. philippinarum</i>		Mantle					
Source of variation	d.f.	Protein contents		PO activity		SOD activity	
		F	p	F	p	F	p
Main plot analysis							
Injection	2	14,59	0,00496	4,098	0,0755	0,925	0,437
Error (tank)	6						
Subplot analysis							
Temps	5	15,035	2,08E-07	18,825	1,88E-08	13,039	8,75E-07
traitement × temps	10	5,758	8,69E-05	2,963	0,0103	3,763	0,00231
Error (bac × traitement × temps)	30						

Independent variables were injection condition (SSW, CECT4600 and LP2) and time p.i. (0h, 36h, 72h, 7d, 14d and 30d). Significant probabilities are in bold. All data were (log+1) transformed.

Table 3. Summary of the split plot two-way ANOVAs on the effect of injection condition and time p.i. on protein contents, PO and SOD activities in hemolymph of *V. philippinarum*

		Hemolymph					
		Protein contents		PO activity		SOD activity	
Source of variation	d.f.	F	p	F	p	F	p
Main plot analysis							
Injection	2	1,376	0,322	2,39	0,172	0,332	0,73
Error (tank)	6						
Subplot analysis							
					1,36E-		
temps	5	1,428	0,2427	12,462	06	2,114	0,0911
traitement × temps	10	1,985	0,0718	2,869	0,0124	1,04	0,436
Error (bac × traitement × temps)	30						

Independent variables were injection condition (SSW, CECT4600 and LP2) and time p.i. (0h, 36h, 72h, 7d, 14d and 30d).

Significant probabilities are in bold. All data were (log+1) transformed.

4. Discussion

4. 1. Time-inconsistency of the overall response in protein contents and enzymatic activities

The present study reveals a complex interaction between the time p.i., the injection condition and the tissue considered. Indeed, kinetic responses of protein contents, PO and SOD activities do not highlight a consistent pattern. Protein contents do not vary significantly whether the injection and time p.i. in EPFs, hemolymph serum while an increase is observed 36h p.i. in the mantle and then stagnation. Yet, protein contents in fluids of *V. philippinarum* were previously analyzed after an experimental challenge with *V. tapetis* in the pallial cavity. These studies pointed out a significant decrease of protein concentrations in EPFs and hemolymph [6, 18]. In our study, increases and decreases are consecutively noticed in SOD and PO activities depending on the tissue, thus making it difficult to draw conclusions about

these variations over the time. Though, these enzymes were never monitored, to our knowledge, for such long periods of time in manila clams challenged with *V. tapetis*.

Additionally, control individuals exhibited variations in protein contents, in PO and SOD activities over the time p.i., revealing a response to this treatment. These shifts could be considered as the results of clams' manipulation especially during experimental injection. Indeed, clams were emerged for 12 hours and then injected through the periostracal lamina with a syringe, thus inducing a response to this potential stress in addition to the injected liquid.

Finally, another factor contributing to the inconsistency of the overall response of protein concentrations and enzymatic activities in this study could be the inter-individual variability, particularly observed in fluids.

Notwithstanding these inconsistent variations over the total duration of experiment considering all factors together, significant interactions are highlighted and are coherent with previous studies.

4. 2. Tissue-dependent response of enzymatic activities

A main result in this study is the differential PO and SOD changes between tissues. Indeed, activities of these enzymes are tissue-dependent whatever the conditions tested (with or without infection). PO activity was higher in the mantle than in serum and correlations between specific activities and protein contents were more marked for the mantle. Differences of pattern between PO activities in various tissues are also known in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* [50].

In our study, correlations between SOD specific activities and protein contents in the mantle and in hemolymph serum suggest two different profiles of SOD-like activities in these tissues. In fact, there are three main types of SOD: intracellular Cu/Zn-SOD (ic Cu/Zn-SOD) which is cytosolic, intracellular Mn-SOD (ic Mn-SOD) which is mitochondrial and extracellular Cu/Zn-SOD (EC-SOD) [51]. This could be coherent with the distribution of the different SOD types and thus, their putative different functioning. Indeed, EC-SOD, which is the only SOD type present in serum, could function differently from other SOD types present in the mantle in terms of mechanism. To date, only ic Cu/Zn-SOD and ic Mn-SOD genes have been identified and characterized in hemocytes and in the gills of *V. philippinarum* [40, 41]. Umasuthan and collaborators [41] pointed out a differential expression of the two SOD genes in terms of tissue and in terms of SOD-type. Attempts to purify and characterize EC-SOD in

bivalves were performed but failed to find SOD activity associated to the purified proteins. Cavortin purified from *C. gigas* [52], Sg EC-SOD purified from *Saccostrea glomerata* [53] and dominin purified from *Crassostrea virginica* [54] are mainly expressed in hemocytes. They possess SOD domains but lack SOD activity. Nevertheless, few studies reported EC-SOD activities in bivalves; Monari and coworkers [55, 56] performed immunoblot analyses of (intracellular and extracellular) Cu/Zn-SODs and showed that EC-SOD, in hemolymph, was induced as the clam *Chamelea gallina* was exposed to anoxia or salinity stresses, whereas Cu/Zn-SOD activity was reduced in hemocytes. These findings are in concordance with different activity profiles of SODs depending on the considered tissue.

4. 3. Time- and tissue-dependent response of protein contents and enzymatic activities

4. 3. 1. A response governed by BRD development

Another factor governing PO and SOD activity variations in our study was p.i. time. Results underlined a response in early times in the mantle and in later times in hemolymph and links with BRD development could be hypothesized. In natural conditions, the first step of BRD is the entry of the pathogen in the pallial space and periostracal lamina colonization. This colonization provokes alterations in periostracum secretions and the lamina is disrupted, permitting *V. tapetis* to penetrate into the Peripheral Extrapallial Fluids (PEFs) [57]. The normal deposition of periostracal lamina is seriously affected, resulting in a characteristic brown conchyolin deposit a few days after challenge with *V. tapetis* in the pallial fluids [58]. If some lesions occur, due to the brown deposit, the bacteria penetrate the external epithelium of the mantle and then, proliferate in the tissues [58, 59]. In our study, the injection was done directly in the peripheral extrapallial cavity (between the mantle and the shell) thus accelerating BRD development by overcoming the periostracal lamina. As this physical barrier was crossed, *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) was, in a way, “helped” during the colonization phase in EFs. This could explain the response observed in the mantle in early times as this tissue is directly in contact with EFs. Maes [60] showed that *V. tapetis* inoculation in the clam pallial cavity induced faster mortalities than balneation exposure as the first physical barrier was bypassed. More recently, Allam *et al.* [59] explored the role of the site of *V. tapetis* injection in manila clam on BRD development. They found that mortalities reached 100% with animals injected in adductor muscle and in central extrapallial space after making a hole in the shell (respectively 12 and 14days p.i.) and highlighted the

role of epithelium and pallial muscle attachment as external barriers. In our study, the concentration of *V. tapetis* used for inoculation was lower than that in Allam *et al.* [59] study (5.10^7 UFC/individual) and no damage was done to the shell for extrapallial injections, explaining our weak percentages of mortalities (1.33% over the 30 days of experiment, data not shown). Previous work demonstrated two times in the general immune response of manila clam to *V. tapetis* pallial cavity injection, a first response within 24 hours p.i. and a second response in later times, 7 to 14 days p.i. [15, 16, 18].

4. 3. 2. An early times response associated with cellular factors in the mantle

In the present study, protein contents, PO and SOD activities rise in the mantle between T0 and 72h p.i. in CECT4600 and LP2 injected clams. Such results were never obtained previously as this is, to our knowledge, the first time this tissue was examined for biochemical analysis in a context of *V. tapetis* injection. These rises in protein contents and enzymatic activities could be explained by synthesis or release of proteins in infected zone to counter bacteria.

PO activity in hemolymph cellular fraction of *C. gigas* was proved to exhibit antibacterial activities against *Vibrios* in short times after challenge (between 0h and 7h p.i.) [61]. This finding is coherent with the increase of PO activity in our study, which could thus be related to *V. philippinarum* defense against *V. tapetis*. Additionally, Umasuthan and collaborators [41, 62] pointed out the involvement of *V. philippinarum* antioxydant enzymes in the antibacterial response against *V. tapetis* by identifying and analyzing expression of genes coding theses enzymes and showed the time-dependance of this response. Moreover, after bacterial challenge, increase in SODs expression was observed within two days p.i. in bivalves and may be associated with scavenging ROS induced by bacteria [40, 41, 62, 63].

The early times response observed in our study was previously detected in hemocytes of infected clams, resulting in an increase of total hemocytes counts in hemolymph and in the EFs [15, 16, 18]. In addition, Allam *et al.* [18] also observed a rise of phagocytic rates in EFs of clams extrapallial-injected with CTC-labeled *V. tapetis* between 30 minutes and two hours p.i. The enzymatic study of leucine-aminopeptidase activity in hemolymph of *V. tapetis*-challenged clams showed similar results: a significant increase three days p.i. in the cellular fraction [15].

Taken together, these results suggest a first response in early times that is mainly a cellular response; high enzymatic levels in hemolymph cellular fractions were interpreted as an increase of enzymes synthesis in activated cells triggered by *V. tapetis* injection [15].

4. 3. 3. A later times response associated with humoral factors in hemolymph and extrapallial fluids

A later-times response was observed in our study, consisting in higher protein contents of acellular fraction of hemolymph and EFs in *V. tapetis* injected-clams. Indeed, in hemolymph, protein concentrations were higher in CECT4600-injected clams between 3 and 14 days p.i. and, in EFs, they were higher in both CECT4600- and LP2-injected clams 7 days p.i.. These results are different from those obtained by Allam *et al.* [12] who found increased protein concentrations in clams injected in central extrapallial space three days p.i., whether the treatment was (i.e., bacteria or SSW). According to the author, this augmentation of protein concentration was associated to the shell damage repair as central extrapallial injection was performed by making a hole in the central part of the shell [12]. In our study, peripheral extrapallial injection of *V. tapetis* was done by inserting a needle between mantle and shell so that no damage occurred on the shell, explaining differences with Allam *et al.* study. Augmentations in protein contents in fluids in later times were observed only in bacteria-injected clams suggesting the synthesis or secretion of enzymes, peptides in extracellular compartments in order to counteract the bacteria [15]. It should be noted that between 0 and 36 hours p.i. protein contents in EFs were decreasing whether the injection's condition was (SSW or bacteria). We interpreted this result as a 'dilution-effect' post-injection as a certain volume of SSW or bacteria solution was added to the EFs during injection.

In our study, PO activity in hemolymph supernatant rose between 7 and 14 days p.i. in CECT4600- and LP2-injected clams and stagnates until the end of experiment.

Phenoloxidase exists in an inactive form, proPO, which is located in hemocytes granules of invertebrates. Degranulation of semigranular and granular hemocytes is induced by lipopolysaccharides, bacteria and can be caused by proteins involved in proPO cascade [29]. After degranulation in hemolymph, proPO is activated by proteolytic cleavage by serine proteases, yielding to the active PO [26]. So, in our study, we could hypothesize that the increase of PO activity in acellular fraction in later times could be associated to hemocyte degranulation induced by *V. tapetis* challenge. This would also be coherent with results of Allam & Ford [64] who established a loss of granules in hemocytes after *V. tapetis* challenge in *V. philippinarum*.

In the present study, SOD activity in hemolymph supernatant rose to its maximum at day 7 p.i. in CECT4600-injected clams and then, decreased until the end of experiment. The extracellular isozyme of SOD, EC-SOD, is a copper and zinc containing enzyme produced in

hemocytes and secreted into extracellular fluids, where it represents the major SOD-isoenzyme [65]. An EC-SOD gene was characterized in bay scallop, *Argopecten irradians*, and its expression in hemocytes was studied during the 48 hours following a *Vibrio anguillarum* challenge [66]. Results of this study established the time-dependance of EC-SOD expression in hemocytes with a peak of gene-expression in early times p.i. (12 hours p.i.) but its activity in serum was not assessed. This difference in kinetic response of EC-SOD activity and the expression of its associated gene might be due to several factors such as post-transcriptional regulation, the putative activation of inactive form of EC-SOD and the excretion of it into extracellular compartment [51]. This is the first time to our knowledge that EC-SOD activity was studied into hemolymph acellular fraction in a bivalve challenged with *Vibrio* sp., so, in order to confirm this hypothesis, it would be interesting to analyze gene expression of SOD and PO.

In previous work, the later times response observed in *V. philippinarum* challenged with *V. tapetis* resulted in THC rise to its maximum at 7-14 days p.i. and its decrease after 14 days p.i.; this decrease would be attributed to hemocytes mobilization into infection sites [15, 18].

Additionally, LAP activities in acellular fraction of hemolymph reached their peak 7 days p.i. [15] and lysozyme activity in this same fraction was significantly higher in infected clams 14 and 28 days p.i. [18].

More generally, as hemolymph is a circulating fluid, a later time response could be explained by an “integration time” needed by the organism to counteract the infection and also by the fact that the response is diluted in the whole organism.

4. 4. Pathogenicity of *V. tapetis*

Our results suggest two different responses toward injections: a non-specific response related to a “bacteria-effect” and a specific response associated to CECT4600 higher pathogenicity, that are time- and tissue-dependent. “Bacteria-effect” or non-specific response was mainly observed in tissues that were directly in contact with injection, i.e., mantle and EFs. Protein contents, PO and SOD activities were significantly higher in CECT4600- and LP2-challenged clams 36 hours p.i. in mantle and 7 days p.i. in EFs. This higher protein concentration can be explained by a synthesis and/or a release of proteins in the affected tissues in order to counteract the bacteria. PO and SOD, two major enzymes involved in innate immunity, were activated following the injection with bacteria, meaning that toxic compounds were produced in order to block bacteria proliferation. In the mantle, PO and SOD activities were

significantly higher in LP2-challenged clams than in CECT4600- and SSW-injected clams three days p.i. In hemolymph, protein contents, PO and SOD activities were higher in the case of CECT4600-injection, respectively 3-14 days p.i., 14 days p.i. and 7 days p.i. These results indicate a specific biochemical response and lead us to the conclusion that there are differences between pathogenicities of the two *V. tapetis* strains or a better immune defense from manila clam. This is also in accordance with BRD stages (Conchyolin Deposit Stages) determined in clams 30 days p.i. as almost all CECT4600-challenged individuals were symptomatic whereas 25% of LP2-challenged ones were still asymptomatic (data not shown). Additionally, the most advanced symptoms were observed in CECT4600-challenged clams and lower stages were found in LP2-challenged ones (data not shown).

To infect organisms and proliferate, *Vibrios* have to counter host's defense by different means: phagocytosis inhibition, oxidative burst prevention, deregulation of signaling pathways [67, 68]. Interactions between host's immune defenses and pathogen's virulence factors depend on *Vibrio* pathogenicity [69]. This is why two *V. tapetis* strains were injected in *V. philippinarum* in this study, CECT4600, isolated from BRD-affected *V. philippinarum* in 1990 [43, 70], and LP2, isolated from the fish *Symphodus melops* in 1999 in Norway [9]. The later is supposedly to be less pathogenic to manila clam.

V. tapetis possess several virulence factors that could explain the pathogenicity of the two strains used in this study. For example, the adhesion to cells/tissues is an important factor of pathogenicity and is performed with the presence of pili in *V. tapetis* [5, 71]. The cell wall composition in smooth lipopolysaccharides is also decisive in *V. tapetis* pathogenicity, as it permits the bacterium to enter easier host's cells/tissues and avoid the phagocytosis [59]. Other virulence factors include hemolysins, cytotoxins, exotoxins and plasmid which allow the bacteria to survive, to proliferate and to invade the host tissues [71, 72]. Pathogenicity of *V. tapetis* was mainly studied in manila clam hemocytes and pointed out several shifts such as cell rounding, vacuolizations, loss of adherence capacity [11, 12]. Lopez-Cortez *et al.* [73] established that clams phagocytic activities were independent from pathogenicity degrees and host-range specificity of *V. tapetis* strain, soluble hemolymph proteins are not required for identification and internalization of the bacteria. These results support the non-specificity of immune response toward the different strains we used in this study.

Moreover, Choquet *et al.* [9] compared different strains of *V. tapetis* and classified LP2 strain as having a relatively low cytotoxic activity, whereas CECT4600 strain is highly cytotoxic. This is coherent with our results and explains the specific response obtained toward the two

strains tested. However, toxicity mechanisms are poorly understood even if some factors have been identified.

Conclusion

Lastly, this study highlights the modulation of two enzymes involved in immune response of *V. philippinarum* to bacterial infection, phenoloxidase and superoxide dismutase. The bacteria *V. tapetis* induces a time- and tissue-dependent response in the manila which can be separated in two times. First, an early times response occurs in the mantle, close to injection site, and is associated with an increase of protein contents, PO and SOD activities. Afterwards, a latter response was observed in the clams' fluids resulting in an increase of PO activities and a decrease of SOD activities. These two times in immune response were observed in previous work by studying cellular and humoral components of *V. philippinarum* injected with *V. tapetis* [15, 16, 18]. Another main result of this study is the difference of pathogenicity existing between the two *V. tapetis* strains characterized by higher levels of enzymes' activities in hemolymph (between 7 and 30 days) and lower levels in mantle (72h p.i.) in CECT4600-injected clams. This work illustrates well the host-pathogen interaction and its consequences on two particular enzymes, with fixed environmental conditions. This interaction can be modulated by environmental factors, and, particularly, temperature [74-76]. Further studies could focus on the impact of environmental conditions in manila clam's response to *V. tapetis* and in the pathogen's virulence.

Acknowledgements

This work was supported by the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19) and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir". This work was also funded by University of Western Brittany. We would first like to thank the SATMAR company for providing the clams. We thank Adeline Bidault-Toffin, Nelly Le Goïc, Jérôme La Peyre, Romain Lavaud, Sébastien Artigaud, Malwenn Lassudrie, Camille Lacroix, Mélanie Mercier, Marc Long, and Mickael Perrigault for their help for the samplings.

References

1. Flassch J-P, Leborgne Y. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement. Introductions and Transfers of Aquatic species Selected papers from a Symposium Held in Halifax, Nova Scotia, 12-13 June 1990; 1992.
2. Paillard C, Maes P. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. Comptes rendus de l'Académie des sciences Série 3, Sciences de la vie. 1990 310:15-20.
3. Paillard C. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilitation à diriger des recherches (HDR), Université de Bretagne Occidentale, Brest. 2004.
4. Paillard C. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Aquatic Living Resources. 2004 17:467-75.
5. Paillard C, Maes P, Oubella R. Brown ring disease in clams. Annual Review of Fish Diseases. 1994 4:219-40.
6. Allam B, Paillard C, Howard A, Le Pennec M. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. Diseases of aquatic organisms. 2000 41:105-13.
7. Reid HI, Duncan HL, Laidler LA, Hunter D, Birkbeck TH. Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture. 2003 221:65-74.
8. Castro D, Martinez-Manzanares E, Luque A, Fouz B, Morínigo M, Borrego J, *et al.* Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. Diseases of aquatic organisms. 1992 14:229-36.
9. Jensen S, Samuelsen OB, Andersen K, Torkildsen L, Lambert C, Choquet G, *et al.* Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkscrew wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. Diseases of aquatic organisms. 2003 53:25-31.
10. Matsuyama T, Sakai T, Kiryu I, Yuassa K, Yasunobu H, Kawamura Y, *et al.* First isolation of *Vibrio tapetis*, the Etiological Agent of Brown Ring Disease (BRD), in Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. Fish Pathology. 2010 45 (2):77-9.
11. Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas J-L, Paillard C. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. Diseases of aquatic organisms. 2003 57:109-16.
12. Allam B, Ford SE. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge. Fish & shellfish immunology. 2006 20:374-83.
13. Jeffroy F, Paillard C. Involvement of nitric oxide in the *in vitro* interaction between Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*. Fish & shellfish immunology. 2011 31:1137-41.
14. Oubella R, Maes P, Paillard C, Auffret M. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). Diseases of aquatic organisms. 1993 15:193-7.
15. Oubella R, Paillard C, Maes P, Auffret M. Changes in Hemolymph Parameters in the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) Following Bacterial Challenge. Journal of invertebrate pathology. 1994 64:33-8.

16. Oubella R, Maes P, Allam B, Paillard C, Auffret M. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). Aquatic Living Resources. 1996 9:137-43.
17. Allam B. Rôle des fluides extrapalléaux des bivalves dans la défense immunitaire: cas de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage, *Ruditapes philippinarum*; 1998.
18. Allam B, Paillard C, Auffret M. Alterations in Hemolymph and Extrapallial Fluid Parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Challenged with the Pathogen *Vibrio tapetis*. Journal of invertebrate pathology. 2000 76:63-9.
19. Gillespie and JP, Kanost MR, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. Annual review of entomology. 1997 42:611-43.
20. Beutler B. Innate immunity: an overview. Molecular immunology. 2004 40:845-59.
21. Bachere E, Mialhe E, Noel D, Boulo V, Morvan A, Rodriguez J. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. Aquaculture. 1995 132:17-32.
22. Little TJ, Hultmark D, Read AF. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. Nature immunology. 2005 6:651-4.
23. Gestal C, Costa M, Figueras A, Novoa B. Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides. Gene. 2007 406:134-43.
24. Chu F-LE. Defense mechanisms of marine bivalves. Recent advances in marine biotechnology. 2000 5:1e42.
25. Xing J, Lin T, Zhan W. Variations of enzyme activities in the haemocytes of scallop *Chlamys farreri* after infection with the acute virus necrotoxic virus (AVNV). Fish & shellfish immunology. 2008 25:847-52.
26. Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current opinion in immunology. 1998 10:23-8.
27. Rodriguez-Lopez JN, Tudela J, Varon R, Garcia-Carmona F, Garcia-Canovas F. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. Journal of Biological Chemistry. 1992 267:3801-10.
28. Aladaileh S, Rodney P, Nair SV, Raftos DA. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2007 148:470-80.
29. Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends in immunology. 2008 29:263-71.
30. Peters R, Raftos DA. The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Aquaculture. 2003 223:29-39.
31. Newton K, Peters R, Raftos D. Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Developmental & Comparative Immunology. 2004 28:565-9.
32. Cong R, Sun W, Liu G, Fan T, Meng X, Yang L, *et al.* Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. Fish & shellfish immunology. 2005 18:61-70.
33. Le Bris C, Paillard C, Stiger-Pouvreau V, Guérard F. Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties. Fish & shellfish immunology.
34. Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C, Leboulenger F. The point about oxidative stress in molluscs. ISJ. 2005 2:91-104.
35. Labreuche Y, Soudant P, Gonçalves M, Lambert C, Nicolas J-L. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and

- cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*. 2006 30:367-79.
36. Buggé DM, Hégaret H, Wikfors GH, Allam B. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish & shellfish immunology*. 2007 23:188-96.
 37. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current opinion in immunology*. 2000 12:64-76.
 38. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*. 2004 2:820-32.
 39. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*. 1969 244:6049-55.
 40. Li C, Sun H, Chen A, Ning X, Wu H, Qin S, *et al.* Identification and characterization of an intracellular Cu, Zn-superoxide dismutase (icCu/Zn-SOD) gene from clam *Venerupis philippinarum*. *Fish & shellfish immunology*. 2010 28:499-503.
 41. Umasuthan N, Bathige S, Revathy KS, Lee Y, Whang I, Choi CY, *et al.* A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from *Ruditapes philippinarum*: Comparative structural-and expressional-analysis with copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) and biochemical analysis of its antioxidant activities. *Fish & shellfish immunology*. 2012.
 42. Paillard C, Maes P. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *Journal of invertebrate pathology*. 1995 65:91-100.
 43. Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT, *et al.* *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *International journal of systematic bacteriology*. 1996 46:480-4.
 44. Choquet G. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise. Brest: Université de Bretagne Occidentale; 2004.
 45. Corporeau C, Vanderplancke G, Boulais M, Suquet M, Quéré C, Boudry P, *et al.* Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of proteomics*. 2012.
 46. Guévelou E, Huvet A, Galindo-Sánchez CE, Milan M, Quillien V, Daniel J-Y, *et al.* Sex-Specific Regulation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Biology of reproduction*. 2013:biolreprod. 113.109728.
 47. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976 72:248-54.
 48. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. In: *Computing RfFS*, editor. Vienna, Austria; 2013.
 49. Faria JC, Jelihovschi E, Allaman IB. TukeyC: Conventiönnal Tukey Test. R package version 1.1-0. 2012.
 50. Luna-Acosta A, Thomas-Guyon H, Amari M, Rosenfeld E, Bustamante P, Fruitier-Arnaudin I. Differential tissue distribution and specificity of phenoloxidasés from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2011 159:220-6.
 51. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002 33:337-49.
 52. Scotti PD, Dearing SC, Greenwood DR. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 2007 41:91-101.

53. Green TJ, Dixon TJ, Devic E, Adlard RD, Barnes AC. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish & Shellfish Immunology*. 2009 26:799-810.
54. Itoh N, Xue Q-G, Schey KL, Li Y, Cooper RK, La Peyre JF. Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2011 158:9-22.
55. Monari M, Matozzo V, Foschi J, Marin MG, Cattani O. Exposure to anoxia of the clam, *Chamelea gallina*: II: Modulation of superoxide dismutase activity and expression in haemocytes. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 2005 325:175-88.
56. Monari M, Matozzo V, Foschi J, Cattani O, Serrazanetti GP, Marin MG. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2007 22:98-114.
57. Allam B, Paillard C. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Diseases of aquatic organisms*. 1998 33:123-8.
58. Paillard C. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resources*. 2004 17:467-75.
59. Allam B, Paillard C, Ford SE. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis Aquat Org*. 2002 48:221-31.
60. Maes P. Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins d'intérêt commercial, *Ruditapes philippinarum* et *Paracentrotus lividus*. Brest: Université de Bretagne Occidentale; 1992.
61. Luna-Acosta A, Saulnier D, Pommier M, Haffner P, De Decker S, Renault T, *et al*. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish & shellfish immunology*. 2011 31:795-800.
62. Umasuthan N, Saranya Revathy K, Lee Y, Whang I, Lee J. Mitochondrial thioredoxin-2 from Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) is a potent antioxidant enzyme involved in antibacterial response. *Fish & Shellfish Immunology*. 2012 32:513-23.
63. Gao X, He C, Liu H, Li H, Zhu D, Cai S, *et al*. Intracellular Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) from hard clam *Meretrix meretrix*: its cDNA cloning, mRNA expression and enzyme activity. *Molecular biology reports*. 2012 39:10713-22.
64. Allam B, Paillard C, Auffret M, Ford SE. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following *in vivo* challenge. *Fish & shellfish immunology*. 2006 20:384-97.
65. Marklund SL. Analysis of extracellular superoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids. *Methods in enzymology*. 1990 186:260-5.
66. Bao Y, Li L, Wu Q, Zhang G. Cloning, characterization, and expression analysis of extracellular copper/zinc superoxide dismutase gene from bay scallop *Argopecten irradians*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2009 27:17-25.
67. Sindermann CJ. *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish: Diseases of Marine Fishes*: Gulf Professional Publishing; 1990.
68. Pruzzo C, Gallo G, Canesi L. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental microbiology*. 2005 7:761-72.
69. Travers MA, Le Bouffant R, Friedman CS, Buzin F, Cougard B, Huchette S, *et al*. Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *Journal of cellular biochemistry*. 2009 106:152-60.

70. Paillard C, Maes P. The brown ring disease in the manila clam, *Ruditapes philippinarum* II. Microscopic study of the brown ring syndrome. Journal of invertebrate pathology. 1995 65:101-10.
71. Borrego JJ, Luque A, Castro D, Santamaría JA, Martínez-Manzanares E. Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Aquatic Living Resources. 1996 9:125-36.
72. Castro D, Romalde JL, Vila J, Magarinos B, Luque A, Borrego JJ. Intraspecific characterization of *Vibrio tapetis* strains by use of pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and plasmid profiling. Applied and environmental microbiology. 1997 63:1449-52.
73. Lopez-Cortes L, Castro D, Navas JJ, Borrego JJ. Phagocytic and chemotactic responses of manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. Fish & Shellfish Immunology. 1999 9:543-55.
74. Paillard C, Allam B, Oubella R. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Diseases of aquatic organisms. 2004 59:249-62.
75. Travers M-A, Basuyaux O, Le Goïc N, Huchette S, Nicolas J-L, Koken M, *et al.* Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. Global Change Biology. 2009 15:1365-76.
76. Soudant P, E. Chu F-L, Volety A. Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. Journal of invertebrate pathology. 2013 114:196-216.

Combined effect of temperature and virulence of two *Vibrio tapetis* strains on phenoloxidase and superoxide dismutase activities during disease development in the manila clam, *Venerupis philippinarum*

Gaëlle Richard, Cédric Le Bris, Fabienne Guérard, Christophe Lambert, Christine Paillard.
UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER, LEMAR – IUEM – UBO, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise – Rue Dumont d’Urville, 29280 Plouzané, France.

Abstract

Manila clams, *Venerupis philippinarum* (Adams and Reeve, 1850), were experimentally infected with two different bacterial strains and challenged with two different temperatures. Bacterial strains used in this study were *Vibrio tapetis* strain CECT4600, the causative agent of Brown Ring Disease (BRD) and *V. tapetis* strain LP2, supposed non pathogenic to *V. philippinarum*. *Vibrio tapetis* is considered to proliferate at low temperatures [1], i.e. under 21°C. In a global warming context we could hypothesize a decrease of mass mortalities caused by *V. tapetis* but these thermal changes could also directly impact the immune system of the host *V. philippinarum*. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of the infection with *V. tapetis* combined with temperature challenge on two enzymes activities in *V. philippinarum*. More precisely, after infection, phenoloxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD), two major enzymes involved in immune response, were studied for 30 days in two compartments: the mantle and the hemolymph. Conchyolin Deposit Stages (CDS) and Shell Repair Stages (SRS) were also determined 30 days post-injection. In this study, we highlighted that host-pathogen interaction in a varying environment affects the enzymatic response of the host. The coupled effect of *V. tapetis* injection and temperature challenge was detected 30 days post injection and resulted in pathogenicity differences. These findings were supported by CDS and SRS determination in clams and lead to the conclusion that clam’s immunity could be enhanced at 22°C while *V. tapetis* virulence is lowered at this temperature.

Another result of our study was the increase of PO and SOD basal activities as clams are exposed to warmer temperature.

Keywords: *Venerupis philippinarum*; *Vibrio tapetis*; temperature; Phenoloxidase; Superoxide Dismutase; interaction.

1. Introduction

Global change is a real threat to marine invertebrates because increased atmospheric CO₂ is causing ocean warming and acidification [2, 3]. In this climate change context, recent studies underlined the fact that mass mortality events and diseases are becoming more frequent in marine ecosystems [4-6]. Filter feeding invertebrates are particularly exposed to these diseases because to capture their food they have to filter great volume of water, potentially containing microbes and bacteria, through their gills [7]. An example of this marine invertebrate's susceptibility to bacteria present in their environment, is the case of the Brown Ring Disease (BRD) affecting the manila clams *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) along European coasts [8]. *V. philippinarum*, native to the Indo-Pacific was introduced in France between 1972 and 1975 for aquaculture purposes because of its faster growth rate compared to the indigenous clam, *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) [8, 9]. Fifteen years after its introduction in France, the first mortality events occurred in the first production site in Landeda (North Finistère, Brittany) [10, 11]. These mortalities were associated with a characteristic symptom: an accumulation of a brown organic matrix on the peripheral inner shells [12] giving to this disease its name: Brown Ring Disease (BRD). Since 1987, the BRD spread along French and European coasts [8] and more recently, the disease symptoms have also been reported in clams in South Korea in 2003 [13] and in Japan in 2008 [14]. The BRD is caused by the gram-negative bacterium *Vibrio tapetis* [11, 15] which binds to the periostracal lamina of the manila clam and inhibits the normal process of biomineralization. This inhibition of shell synthesis leads to the formation of a brown organic deposit of conchiolin on the mantle edge and also a degradation of the periostracal lamina [16, 17]. More precisely, conchiolin deposits form the first step of diseased animal defense enrobing bacteria [17]. A second step, in infected animals, results in the formation of new calcified layers above the conchiolin deposits. It is possible to evaluate firstly the disease progress through a Conchiolin Deposit Stage (CDS) and secondly the shells repair through a Shell Repair Stage

(SRS) [8, 18]. If the clam defense mechanisms are not sufficient, the development of the disease results in the penetration of *V. tapetis* in the extrapallial fluids and then, if tissue lesions occur, penetration into the tissues and into the hemolymph leading to animal death by a generalized septicemia [19, 20].

This host-pathogen interaction is actually a tripartite interaction because the environmental temperature appears to be a strong influence factor on the progression of the BRD as it impacts both on the pathogen and on the host. In fact, *V. tapetis* CECT4600 (strain isolated in 1990 in France) optimal growth temperature is around 20°C and temperatures up to 27°C are lethal for it [21, 22]. The optimal temperature for the development of the BRD is around 14°C and between 15 and 21°C the disease progression is negatively correlated with the temperature [21] that's why BRD is considered as a cold water disease and also why BRD events do not occur in tropical latitudes. The thermal factor also explains the disease annual cycle observed in clam stocks: number of diseased organisms increases during winter when water temperature is pretty low [1, 23]. The environmental temperature also influences the host immune parameters since in clams maintained at 21°C, infected with *V. tapetis* CECT4600, the dead hemocyte percentage is lower and Leucine AminoPeptidase (LAP) and lysozyme activities are higher than those of animals maintained at 14 or 18°C [1]. A better shell repair at 21°C confirms the hypothesis that temperature has a positive influence on the manila clam immune system [1].

BRD is characterized by the interaction between a host, *V. philippinarum*, and a pathogen, *V. tapetis* and as highlighted by numerous studies this kind of interaction is characterized by an extreme specificity and a sophisticated interplay between host and parasite [24]. So, to better understand the impact of factors, such as the thermal factor, it is not enough to study the impact of it on each interaction player but both at the same time.

Thus, the objective of this study is to investigate the effect of thermal factor on the interaction between the manila clam and *V. tapetis*. More specifically, the aim is to study the impact of temperature on the immune system of *V. philippinarum* exposed to two strains of *V. tapetis* presenting different virulence. To evaluate the immune capacity of the host species we decided to monitor two enzyme activities: phenoloxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD). PO (E.C. 1.14.18.1, E.C. 1.10.3.1 and E.C. 1.10.3.2) are copper-binding enzymes converting phenol compounds to unstable quinones which are then non-enzymatically polymerized into melanin and its derivatives [25-27]. These compounds are important elements of immune system with their fungistatic, bacteriostatic and antiviral properties [28] and POs are also key enzymes of invertebrate immune system thanks to their involvement in

self/non-self recognition, phagocytosis and nodule formation [29-31]. SOD (E.C. 1.15.1.1) is another oxidoreductase enzyme of immune system preventing reactive oxygen species (ROS) accumulation [32]. Both enzymatic activities have been followed through disease development and recovery in different compartments: the mantle, which is the first tissue in contact with the bacterium after its binding on the periostracal lamina and the hemolymph which is the circulating fluid.

2. Materials and methods

2. 1. Biological material and acclimation procedure

For this study, more than 1000 adult clams, *V. philippinarum*, were supplied by SATMAR (Aquaculture Company – Ile Tudy – South Finistère – France). These clams, 39.44 ± 1.96 mm length, were transferred to the laboratory (LEMAR - Institut Universitaire Européen de la Mer, Brest, France), were divided into 18 aerated tanks and acclimated for one week before the injections. Nine of these tanks contained $15.3 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ water and the 9 remaining tanks contained $22.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$. For each tested temperature 3 conditions were applied and tested in triplicates: *V. tapetis* CECT4600 injections, *V. tapetis* LP2 injections and Sterile Sea Water (SSW) injections (control).

2. 2. Bacterial strains

For this study, the following cultured bacterial strains were used:

-*Vibrio tapetis* CECT4600 (which junior synonym is *Vibrio* Prédominant 1: VP1), pathogenic agent of the BRD in clams and isolated from diseased *V. philippinarum* in 1990 in Brittany (France ; [15, 17]). To date this strain is still considered as the most pathogenic *V. tapetis* strain to *V. philippinarum* [33].

-*Vibrio tapetis* LP2, isolated from *Symphodus melops* in 1999, in Norway [34]. This strain is less pathogenic to *V. philippinarum* than CECT4600 strain after *in vivo* pallial cavity inoculation or after *in vitro* biotests [33, 35].

These strains were cultured in Zobell's medium overnight at 18°C and the bacterial-cell concentrations were determined by spectrophotometry at 490nm. (a correlation between direct counts of colony forming unit and optical density had been established previously).

2. 3. Experimental injection

Animals were removed from their tank 12 hours before injections and let at air temperature close to their respective tank temperature (i.e. 15 or 22°C). Clams were replaced in sea water (at temperature depending to their tank), just before injections in order to facilitate their opening. For each thermal condition, one third of the animals were injected with 100µL of Sterile Sea Water (SSW), a third of animals were injected with 100µL of *V. tapetis* CECT4600 suspension (106 CFU.mL⁻¹) and the last third of animals received 100µL of *V. tapetis* LP2 suspension (106 CFU.mL⁻¹). Injections were done, for the first time in the peripheral extrapallial fluids localized under the mantle (between the pallial line and the edge of the shell) for *V. tapetis* strains bypass the first biological barrier (mucus and periostracal lamina). This has been performed with sterile needle (25G 0.5 × 16 mm) fitted onto a 1mL sterile syringe. The needle was cut to obtain a length in average 0.2cm, smaller than the width of the pallial line. After the injections, animals were maintained for 6 hours out of sea water to force them to remain closed, avoiding rejection of the suspension. Then animals were replaced into their aerated tanks.

2. 4. Fluid and tissue collection

For each sampled animal, hemolymph and mantle were collected. For each sampling time, 15 animals (5 in each tank) were collected for each condition. Clams were sampled before the injections (time T0), 72 hours and 30 days post-injection (p.i.). For hemolymph, the protein and enzymatic assays were done on the serum (acellular fraction).

2. 4. 1. Hemolymph collection

Clam hemolymph was withdrawn from the posterior muscle using a sterile needle (25G 0.5× 16 mm) fitted onto a 1mL sterile syringe, through the shell hinge. Collected hemolymph was then centrifuged at 785g for 10 minutes at 4°C, to separate the cellular fraction from the acellular one. The resulting serum was stored at -80°C until use.

2. 4. 2. Tissue collection

After hemolymph collection, the mantle was dissected, frozen in nitrogen and powdered by grinding with liquid nitrogen in a Retsch MM 400 blender. The powder thus obtained was stored at -80°C. Powder was then resuspended in 500µL of lysis buffer [36, 37] and homogenized using Ultra-Turrax (Modèle PRO 200). Homogenized powder was centrifuged at 10 000g for 45 minutes at 4°C and supernatant thus obtained was use for enzymatic and protein assays.

2. 5. Protein determination

For all the samples (hemolymph serum and mantle lysate supernatant) the total protein content was determined by the Bradford method [38] using BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad France) and Bovine Serum Albumin (BSA) as the protein standard.

2. 6. Enzyme activity assays

2. 6. 1. Phenoloxidase assays

PO activity was assayed, in 96-well microplates, spectrophotometrically according to the protocol of Le Bris et al. [39]. Briefly 50 μ L of enzymatic solution (Hemolymph serum and mantle lysate supernatant) and 50 μ L of Tris-HCl buffer (0.10M, pH 8.0) were incubated for 10 minutes at 25°C before adding 100 μ L 0.04M L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). L-DOPA, which is commonly used to assay PO activity, is a common substrate to the three PO subclasses. Absorbance (A) of reaction mixtures was measured using a microplate spectrophotometer (POLARstar Omega – BMG Labtech). Absorbance was measured for 30 minutes, at 492nm and 25°C. Simultaneously, the spontaneous oxidation of L-DOPA was measured, replacing enzymatic solution with pure water in blank runs, and the values thus obtained were subtracted from the test values. The PO specific activities were calculated as:

$$\text{PO specific activity (U.I. mg protein}^{-1}\text{)} = (\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \times \text{dilution factor}) / \text{Total protein concentration}$$

2. 6. 2. Superoxide dismutase assays

Total superoxide dismutase activity was assayed spectrophotometrically in 96-well microplates (Greiner 96-F-bottom) by an indirect method based on competition of SOD with Water Soluble Tetrazolium salt (WST-1) for reduction of O₂⁻. Briefly, 20 μ L of sample solution and 200 μ L of WST-1 solution were added to each well and gently mixed. The reaction was initiated adding 20 μ L xanthine oxydase (XO) and xanthine mix (enzyme solution) to each well, thus forming superoxide anion used by SOD and WST-1 (SOD Assay kit, SIGMA ALDRICH). Two blanks were performed, one by replacing sample solution with milliQ-water (background reduction of O₂⁻), the other one by replacing sample solution with milliQ-water and enzyme solution with dilution buffer (blank without reaction).

The reduction of WST-1 by O₂⁻ produces a yellowish formazan dye which absorbance can be read at 450nm after 20 minutes incubation at 25°C with POLARstar Omega microplate reader (BMG LABTECH). As the WST-1 reduction rate by O₂⁻ is linearly related to XO activity and

is inhibited by SOD, SOD activity is calculated as an inhibition activity of this reaction. Subsequently, a standard inhibition curve was performed using SOD from bovine erythrocytes (SIGMA ALDRICH). SOD activities were expressed in units (U) per mg of protein ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$); 1 U of SOD being defined as the amount of enzyme inhibiting by 50% the reaction.

2. 7. Classification of BRD syndrome

After tissue and fluids collection, the remaining tissues were removed and BRD diagnostic was done on the shell according to the classification developed by Paillard & Maes [18]. The CDS (Conchiolin Deposit Stage), which takes into account the extent, location and thickness of the conchiolin deposit and shell repair stages (SRS), which takes into account the recovery of conchiolin deposit by calcified layers, were determined for each clam. CDS 0 corresponds to healthy clams and SRS 1 corresponds to diseased clams beginning their repair process. As SRS were evaluated only on diseased clams, no SRS 0 were reported. After the last sampling time, more than 100 clams remained for each condition. These animals were used to do the BRD diagnostic.

2. 8. Statistical analyses

Three-way split-split-plot analyses of variance (ANOVA) were conducted to determine differences in PO, SOD and protein contents in each tissue according to the temperature challenge (fixed effect with two levels: 15°C and 22°C), the injection condition (fixed effect with three levels: SSW, LP2 and CECT4600), time p.i. (fixed effect with six levels: T0, 36 and 72 hours, 7, 14 and 30 days p.i.) and their interaction Injection \times Time p.i. The unit of replication was the tank in which temperature challenged-clams of the same temperature condition were placed (n=9 tanks for each temperature condition). The main plots were temperature levels (15°C and 22°C), subplots were injection levels (SSW, LP2 and CECT4600) and sub-subplots were sampling times (time p.i.). The model used for these analyses was the linear model using the 'aov' function of R that fits an ANOVA model. Where significant differences were obtained, a post-hoc analysis was done using Tukey test to determine which means were significantly different for main effects and interaction effects. Normality of residuals and homoscedasticity were assessed by graphical methods. When necessary, explained variables were transformed using the $\log(x+1)$ transformation in order to satisfy the normality and homoscedasticity assumptions.

For BRD diagnostic analyses, i.e. CDS and SRS which are categorical data with more than two levels, a multinomial logistic regression was performed using the ‘multinom’ function of R. The model used for this analysis considered the counts of clams in each class of CDS or SRS as a function of temperature and injection condition, and their interaction. The significant differences for each condition were calculated using likelihood ratio tests.

All Statistical analyses were carried out using R (version 2.15.3; [40]) using the following packages: TukeyC [41], nnet and car.

3. Results

3. 1. Protein contents

In the mantle, a significant effect of temperature ($F=43.6$, $p=2.5 \times 10^{-5}$) was observed whatever the time and was associated with an increase of protein contents at 22°C (Fig.1.A).

In hemolymph, a significant time, temperature and injection interaction ($F=4.52$, $p=0.007$) significant time and temperature interaction occurred 30 days p.i.: protein contents did not differ whatever the injection at 22°C while there was an increase of those protein contents in LP2- and SSW- challenged clams and, in contrary, a diminution in CECT4600-challenged clams at 15°C (Fig.1.B).

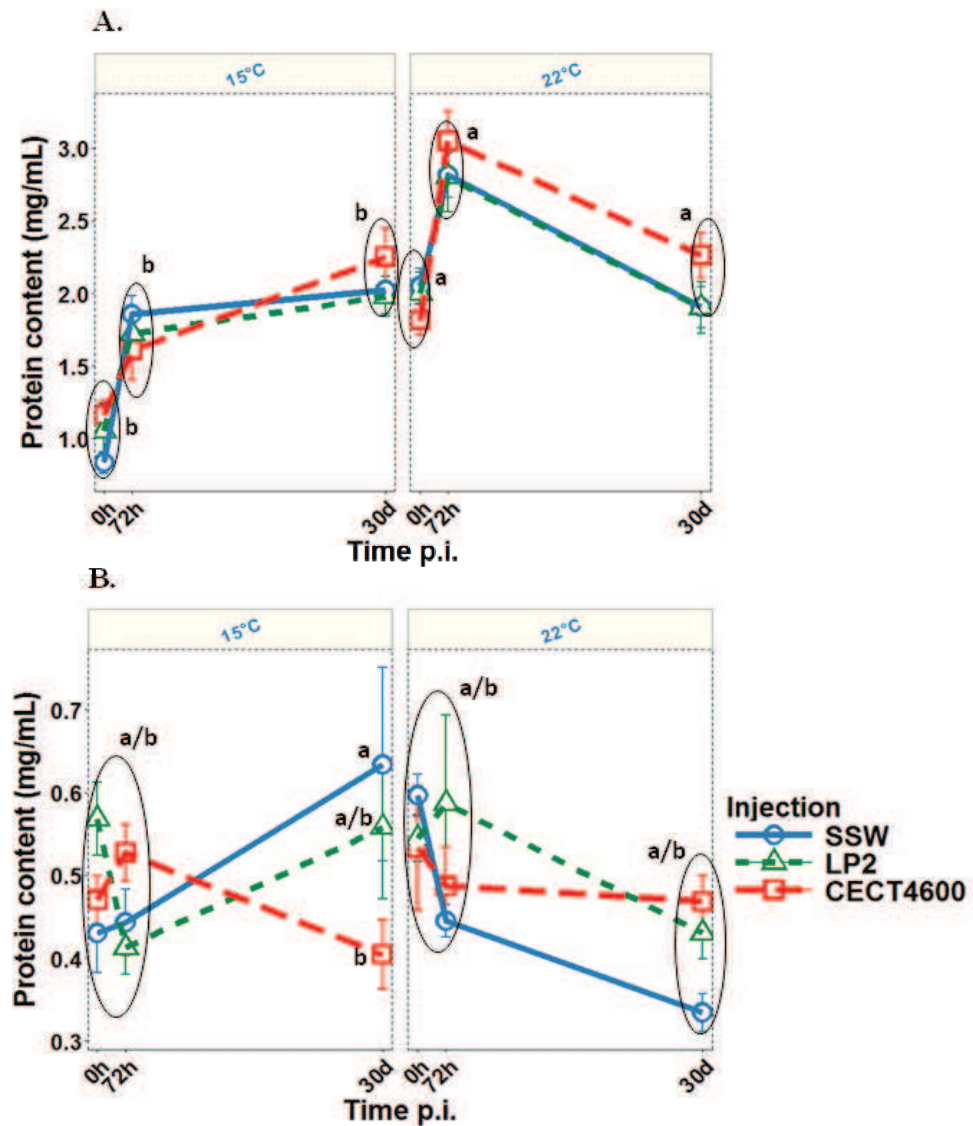


Fig. 1. Mean protein contents in mantle (A), hemolymph (B) of *V. philippinarum* after temperature challenge (15°C and 22°C) and post-injection (p.i.) with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater (SSW). Error bars represent standard error. Letters indicate significant differences in protein contents upon injection and time between groups (Split-plot ANOVA followed by post hoc Tukey HSD test, $\alpha = 0.05$). N = 15 per group.

3. 2. Enzymatic activities

3. 2. 1. PO activities

In the mantle, significant interactive effect of time and temperature ($F=10.74$, $p=0.00047$) and interactive effect of time and injection ($F=4.47$, $p=0.008$) were observed and result in an increase of PO basal activity before injection at 22°C and in a rise of PO activity 30 days p.i. in CECT4600–challenged clams at 22°C (Fig.2.A).

In hemolymph, significant time and temperature interaction ($F=9.3$, $p=0.001$) led to the rise of PO basal activity in CECT4600- and LP2-challenged clams. No temperature and injection interaction was observed ($F=2.17$, $p=0.1569$) but PO activities were at the same level in CECT4600- and LP2-challenged clams 30 days p.i. at 22°C whereas PO activity in CECT4600-challenged clams were above LP2-challenged clams and control clams (Fig.2.B).

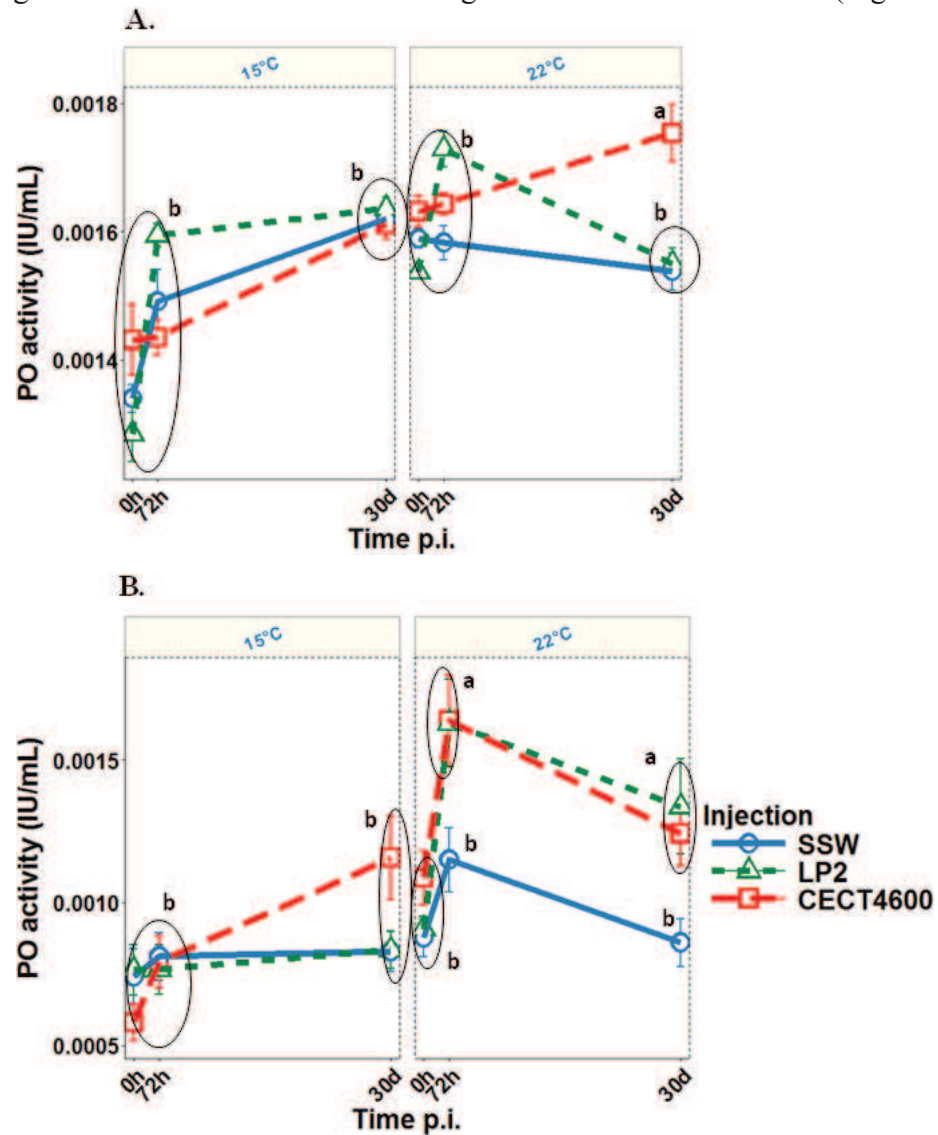


Fig. 2. PO activities in mantle (A), hemolymph (B) of *V. philippinarum* after temperature challenge (15°C and 22°C) and post-injection (p.i.) with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater (SSW). Error bars represent standard error. Letters indicate significant differences in protein contents upon injection and time between groups (Split-plot ANOVA followed by post hoc Tukey HSD test, $\alpha = 0.05$). N = 15 per group.

3. 2. 2. SOD activities

Significant interactions between temperature and time ($F=9.64$, $P= 0.0008$) and between injection and time ($F=3.459$, $p=0.02$) were observed in the mantle. SOD basal activity rose before injection at 22°C and 30 days p.i., SOD activity in CECT4600- and LP2-challenged clams were at the same level at 22°C whereas at 15°C, CECT4600-challenged clams exhibited higher SOD activities than the other injected clams (Fig.3.A).

In hemolymph, only the interaction between time and injection was significant ($F=4.33$, $p=0.008$) but was the same whatever the temperature (Fig.3.B).

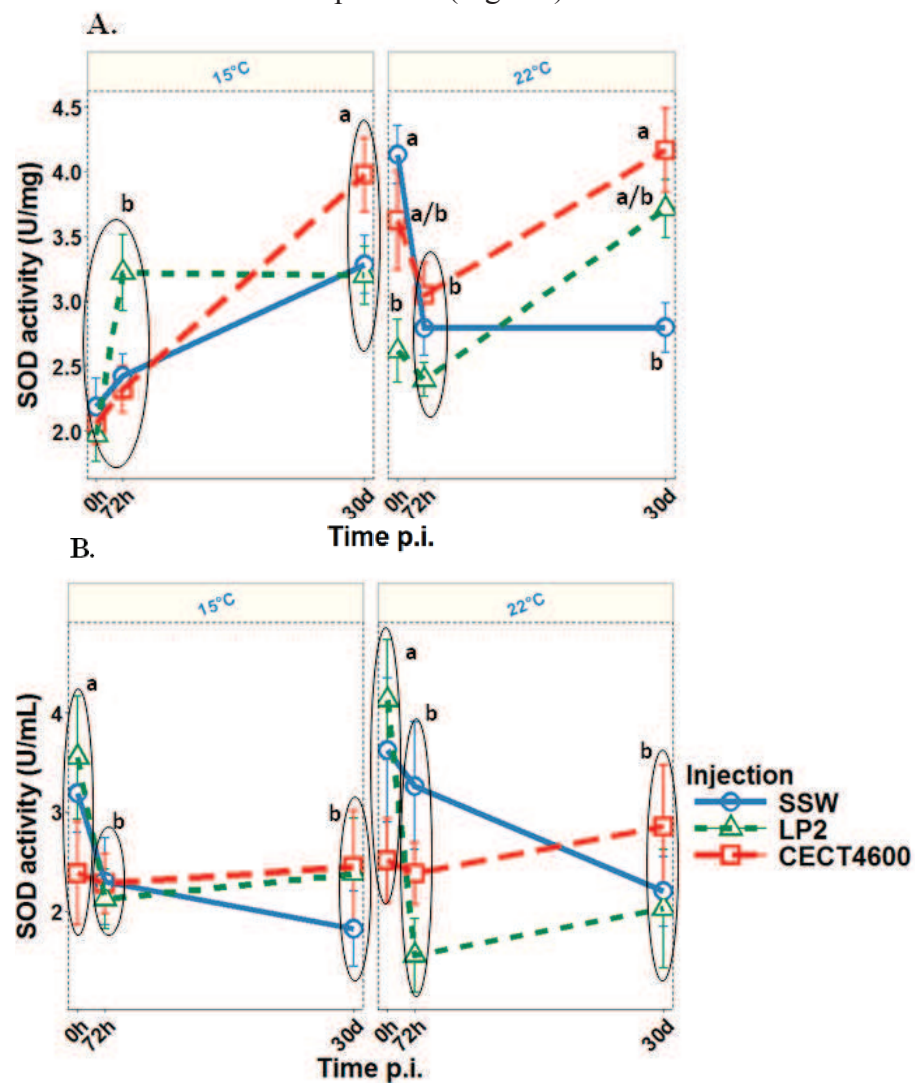


Fig. 3. Mean SOD activities in mantle (A), hemolymph (B) of *V. philippinarum* after temperature challenge (15°C and 22°C) and post-injection (p.i.) with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater (SSW). Error bars represent standard error. Letters indicate significant differences in protein contents upon injection and time between groups (Split-plot ANOVA followed by post hoc Tukey HSD test, $\alpha = 0.05$). N = 15 per group.

3. 3. BRD diagnostic (CDS and SRS)

CDS are evidently injection-dependent and the main significant effect ($\chi=87.5$, $p= 1.49 \cdot 10^{-15}$) of the model. Indeed, almost all individuals were symptomatic when CECT4600-injected whereas, 25% of LP2-challenged clams and more than 50% of control clams were still asymptomatic 30 days p.i. (Fig.4). The temperature effect was also significant ($\chi=9.8$, $p=0.044$) and was associated with the diminution of symptomatic clams at 22°C whatever the injection. A significant interactive effect between temperature and injection ($\chi=53.9$, $p= 7.3 \cdot 10^{-9}$) occurred as the diminution of symptomatic clams in CECT4600-challenged individuals at 22°C was more important as in LP2-challenged-ones.

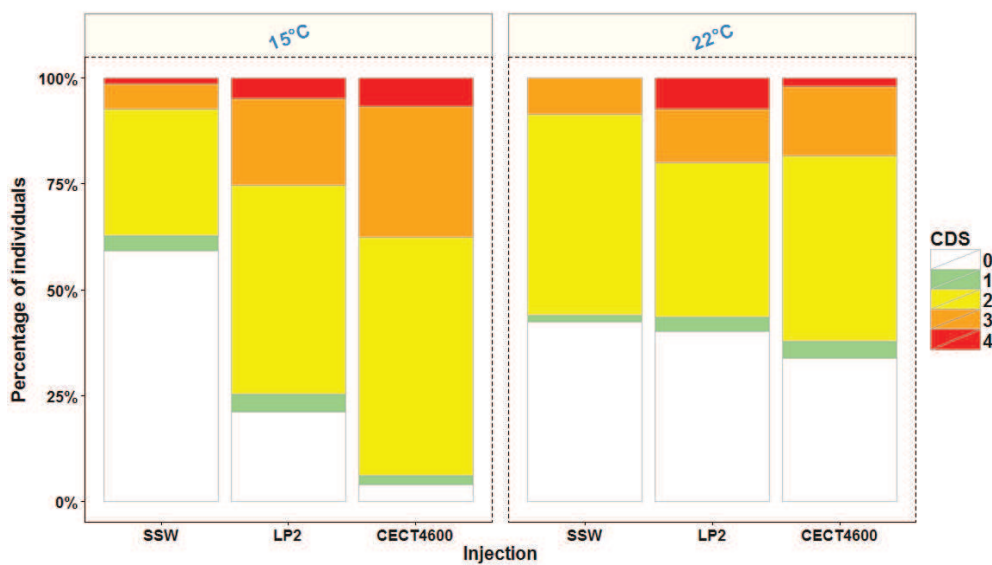


Fig. 4. Conchyolin Deposit Stages (CDS) in *V. philippinarum* 30 days p.i. with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater(SSW) at 15 and 22°C. CDS were determined for more than 100 individuals per injection group.

SRS were also significantly injection dependent ($\chi=20.26$, $p=0.0004$) as control clams always exhibited higher repair stages than LP2- and CECT4600-challenged clams, whatever the temperature. A significant temperature effect ($\chi=39.9$, $p=2.16 \cdot 10^{-9}$) resulted in higher SRS in clams incubated at 22°C seawater, whatever the injection (Fig.5).

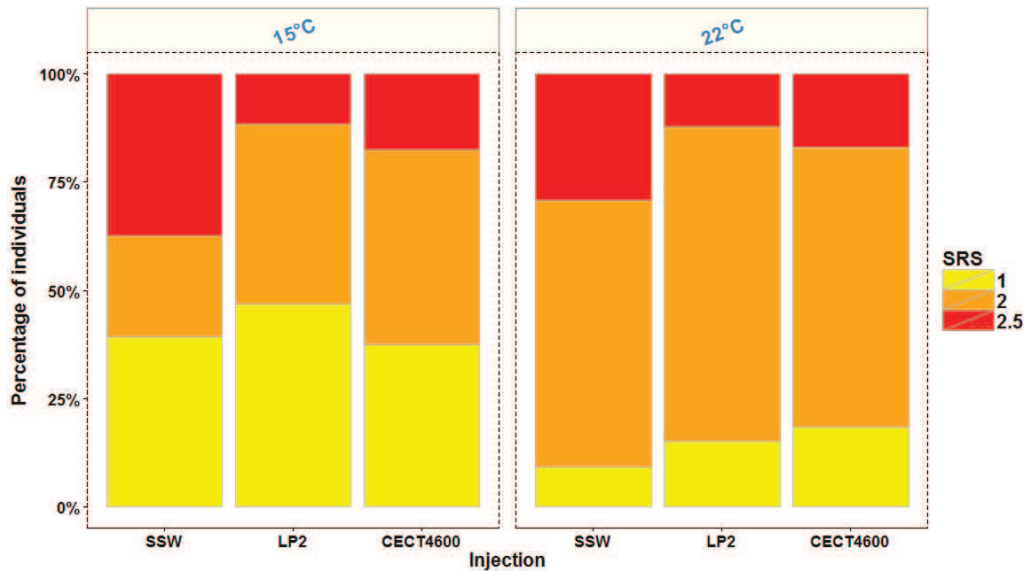


Fig. 5. Shell Repair Stages (SRS) in BRD-symptomatic clams 30 days p.i. with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater (SSW) at 15 and 22°C. SRS were determined for more than 100 individuals per injection group.

Table 1. Summary of the split-split plot three-way ANOVAs on the effect of temperature, injection condition and time p.i. on protein contents, PO and SOD activities in mantle of *V. philippinarum*

		Mantle					
		Protein contents		PO activity		SOD activity	
Source of variation	d.f.	F	p	F	p	F	p
Main plot analysis							
Temperature	1	43,598	2,53E-05	35,93	6,27E-05	26,494	0,000242
Error (Tank)	16						
Subplot analysis							
Injection	2	0,489	6,25E-01	2,59	1,16E-01	2,916	9,29E-02
Temperature × Injection	2	0,014	9,86E-01	2,21	0,152	3,209	0,0765
Error (Tank × Temperature × Injection)	12						
Sub-subplot analysis							
Time	2	30,763	2,38E-07	17,224	2,30E-05	13,657	0,00011
Temperature × Time	2	18,251	1,52E-05	10,736	4,67E-04	9,64	0,000846
Injection × Time	4	0,563	0,692	4,475	0,00764	3,459	0,02286
Temperature × Injection × Time	4	1,295	0,3	1,564	0,216	2,272	0,091
Error (Tank × Temperature × Injection × Time)	24						

Independent variables were temperature (15°C and 22°C), injection condition (SSW, CECT4600 and LP2) and time p.i. (0h, 36h, 72h, 7d, 14d and 30d). Significant probabilities are in bold. All data were (log+1) transformed.

Table 2. Summary of the split-split plot three-way ANOVAs on the effect of temperature, injection condition and time p.i. on protein contents, PO and SOD activities in hemolymph of *V. philippinarum*

Source of variation	Hemolymph						
	d.f.	Protein contents		PO activity		SOD activity	
		F	p	F	p	F	p
Main plot analysis							
Temperature	1	0,001	0,975	27,472	0,000207	0,174	0,689
Error (Tank)	16						
Subplot analysis							
Injection	2	0,644	0,543	2,901	9,38E-02	0,168	0,847
Temperature × Injection	2	0,297	0,748	2,17	0,1569	0,573	0,578
Error (Tank × Temperature × Injection)	12						
Sub-subplot analysis							
Time	2	2,407	0,1115	13,481	0,000119	9,303	0,00102
Temperature × Time	2	4,789	0,0178	9,3	0,001022	0,242	0,78723
Injection × Time	4	0,588	0,6743	1,4	0,264	4,33	0,00886
Temperature × Injection × Time	4	4,525	0,00726	2,185	0,1	1,14	0,36102
Error (Tank × Temperature × Injection × Time)	24						

Independent variables were temperature (15°C and 22°C), injection condition (SSW, CECT4600 and LP2) and time p.i. (0h, 36h, 72h, 7d, 14d and 30d). Significant probabilities are in bold. All data were (log+1) transformed.

Table 3. Summary of the multinomial regression on the effect of temperature, injection condition and time p.i. on CDS and SRS in *V. philippinarum*

Factor	CDS		SRS	
	LR χ^2	p	LR χ^2	p
Temperature	9,808	0,0438	39,907	2,16E-09
Injection	87,509	1,49E-15	20,259	4,40E-04
Temperature × Injection	53,871	7,31E-09	4,874	0,3

Independent variables were temperature (15°C and 22°C) and injection condition (SSW, CECT4600 and LP2). Significant probabilities are in bold.

4. Discussion

In the present study, we have infected clams with two different *V. tapetis* strains: *V. tapetis* CECT 4600 which is, to date, considered as the most pathogenic strain to *V. philippinarum* and *V. tapetis* LP2 which has been isolated on fish. Infected clams were incubated at two

different temperatures in order to evaluate the impact of the thermal factor on the interaction between the clam and its pathogen.

4. 1. Enzymatic activities

The first result was the difference in basal enzymatic activities, before the injections. In fact, at T0 both PO and SOD activities were significantly higher at 22°C than at 15°C. In this study PO and SOD activities were used as potential biomarkers of immune system so the higher level of enzymatic activities at 22°C could be interpreted as better immune abilities for animals acclimated at 22°C compared to animals acclimated at 15°C. This result was consistent with the fact that the growth optimal temperature for *V. philippinarum*, from northern Adriatic lagoons, is comprised between 20 and 24°C [42]. In other words, between these temperatures, the manila clam can devote its energy to its growth because the natural high enzymatic activity level allow the clam to quickly and effectively countered a pathogen intrusion without costing too much energy and without unbalance the energy budget [43]. Similar results were also obtained for cellular immunity of *V. philippinarum* because hemocytes phagocytosis activity and granulocyte number are positively correlated with temperature [1] reflecting better abilities to fight against pathogens. This result was also consistent with Fisher [44] findings who concluded that water temperature can significantly modulate the cellular and humoral activities of marine bivalves. Nevertheless, it must be noted that these higher enzymatic activities were dependent to the optimal growth temperature: for instance when water temperature exceeded 20°C most of the physiological processes of *Apostichopus japonicus*, including phagocytosis, became slower [45] but the optimal growth and food consumption temperature is, for this species, comprises between 14 and 15°C [45]. In the oyster *Crassostrea virginica*, even if total hemocytes counts, phagocytic capability and percentage of granulocytes were higher at high acclimation temperature, animals were more sensitive to *Perkinsus marinus* at these higher temperatures [46].

In this study, the effect of injections seemed to be temperature dependent for both enzymatic activities. For PO activity in hemolymph, 3 days after the injections, the enzymatic activity was increased to a greater extent at 22°C compared to 15°C for the three kind of injection. This result confirms the better abilities of *V. philippinarum* to fight against bacterium at 22°C compared to 15°C. More precisely, in the hemolymph, the trends observed at 15°C were similar for LP2 and SSW injections and different to CECT4600 injection whereas at 22°C, the trends are similar for both *V. tapetis* strains and different to SSW. Considering that variations

of enzymatic activities were proportional to strain pathogenicity, it seemed that at 15°C CECT4600 was more pathogenic than LP2 and it was consistent with results obtained by Choquet et al. [33] who found that CECT4600 is the most pathogenic *V. tapetis* strain for the manila clam. At 22°C PO activity evolution were the same after CECT4600 and LP2 injections meaning that pathogenicity of both strains were quite similar and it could be explained by the fact that optimal temperature of CECT4600 *V. tapetis* strain is around 20°C [21, 22] but between 15 and 21°C BRD symptoms development are negatively correlated with temperature [21]. In hemolymph, the fact that PO activities increased for the three first days before decreasing until the end of the experiment could be interpreted as mechanisms acting to fight against pathogen entrance or, when the increase is less important, as for SSW injections, mechanisms to protect after the opening of the extrapallial cavity by the entrance of the needle. The decrease of PO activity observed from the third day to the end of the experiment was relevant of the quick and effective immune response at 22°C whereas, at 15°C this immune response did not appeared so quick or/and so effective and continued until the end of the experiment. The increase of PO activity level was also observed in the hemocytes of *Venerupis philippinarum* after infection by *Perkinsus atlanticus* [29]. Recently, Liu et al. [47] demonstrated that challenges with two others *Vibrio* species (*V. anguillarum* and *V. splendidus*) could induce immune and oxidative stress in *V. philippinarum* hepatopancreas.

In this study the oxidative stress was investigated through the SOD activity. At 15°C SOD increased during 30 days for the three injection conditions whereas at 22°C the activity decreased for 3 days and then increased. Nevertheless results obtained 30 days after the injections confirmed the findings from PO activity in hemolymph. In fact, 30 days p.i., at 15°C, the SOD activity levels in the mantle were not significantly different for SSW and LP2 injected animals and lower than CECT4600 injected animals whereas at 22°C the SOD activity levels were quite similar for both strain injected animals and significantly higher than for SSW injected animals.

Results obtained in this study with enzymatic activities revealed that at 22°C the immune response was better than at 15°C. While at 15°C a difference in pathogenicity could be supposed between the two *V. tapetis* strains regarding the enzymatic activities, this difference did not appear at 22°C.

4. 2. BRD diagnostic

Two index values could be obtained assessing the BRD diagnostic according to Paillard & Maes [18]. The first one is the CDS which expresses the development of the disease through the extent of conchiolin deposits. Results obtained 30 days p.i. were the most relevant as visual symptoms could not be visible in the few days following the injections (Paillard, pers com). Comparing results obtained for each strain at both temperatures could allow us to conclude about differential pathogenicity as a function of temperature. Thus at 15°C and after 30 days p.i., CECT4600 injections led to less than 4% of asymptomatic clams whereas at 22°C around 35% of clams were still asymptomatic 30 days p.i.. This result confirms the fact that at 22°C *V. tapetis* CECT4600 is less pathogenic than at 15°C and is also consistent with the optimal condition of growth for this strain [21, 22]. There was also an increase of the asymptomatic clams' number between 15 and 22°C for *V. tapetis* LP2 strain but to a lesser extent. In fact, at 15°C around 20% of animals were still asymptomatic whereas at 22°C around 40% of animals were still asymptomatic. In view of CDS values, it seemed that the increase in temperature from 15 to 22°C caused a decrease in pathogenicity of both tested bacteria strains but this decrease appeared to be more important for CECT4600 as compare to LP2. This difference could be explained by the fact that CECT4600 strain has a growth optimal temperature around 20°C [21, 22] whereas LP2 strain's one is 23°C [34]. It may surprise that LP2 strain was not more virulent at 22°C than at 15°C as it was closer to its optimal growth temperature. To understand this result it must be considered that BRD is an interaction between the host, the pathogen and the environment [43] so, even if the environment was favorable for the pathogen, its development could be inhibited by the host immune system which seemed better at 22°C than at 15°C as enzymatic activities suggested.

Clam immune abilities were also investigated through the Shell Repair Stages (SRS) values and this index does not consider the tested strain pathogenicity because it is only estimated on animals exhibiting disease symptoms. For the three tested conditions, the low repair values (i.e. SRS1) were significantly lower at 22°C then at 15°C meaning that shell repair is better at 22°C. This positive correlation between temperature and repair abilities have already been observed in natural environment with higher shell repair stages during spring than during winter [18]. Same results have also been obtained during laboratory experiments with better shell repair in infected clams at 21°C than at 18°C and 14°C [1]. For bacterial injected animals, the clam percentage being SRS2.5 were quite the same at 15 and 22°C: 11% and 12% for LP2 and 18% and 17% for CECT4600, at 15 and 22°C respectively. The percentage

of SRS2 individuals, for injected animals, was significantly increased at 22°C compared to 15°C. This percentage was multiplied by 1.7 for LP2 injected animals whereas it was multiplied by 1.4 for CECT4600 injected clams. So this better repair shell at 22°C is quite comparable for both strains confirming the fact that at 22°C the immune system abilities are increased independently from the bacterial strain.

Conclusion

Results obtained during this experiment led us to the conclusion that thermal factor directly impact the BRD development. As other host-pathogen interaction, BRD is characterized by an extreme specificity and a sophisticated interplay between host and parasite [24]. The studied factor, i.e. the thermal one, impacted the host immune system, the *Vibrio* pathogenicity and so the interaction between both. At 15°C, *V. tapetis* CECT4600 seemed to be more pathogenic than *V. tapetis* LP2 but at 22°C this difference seemed to be cleared. In fact, at 22°C temperature, CECT4600 pathogenicity was decreased and even if LP2 pathogenicity was decreased, it was to a lesser extent than for CECT4600. Moreover, the enhanced immune abilities of clams led to lower BRD development. Thus, in a global warming context, this results suggest that manila clam could face *V. tapetis* infections thanks to better immune abilities (increase of PO and SOD enzymatic activities) but pathogenicity of strains, to date considered as low, could be increased and become new threat for *V. philippinarum*.

Acknowledgements

This work was supported by the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19) and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir". This work was also funded by University of Western Brittany. We would first like to thank the SATMAR company for providing the clams. We thank Adeline Bidault-Toffin, Nelly Le Goïc, Jérôme La Peyre, Romain Lavaud, Sébastien Artigaud, Malwenn Lassudrie, Camille Lacroix, Mélanie Mercier, Marc Long, and Mickael Perrigault for their help for the samplings. We also thank Olivier Gauthier and Fabrice Pernet for their help for statistical analysis.

References

1. Paillard C, Allam B, Oubella R. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Diseases of aquatic organisms. 2004 59:249-62.
2. Byrne M. Impact of climate change stressors on marine invertebrate life histories with a focus on the Mollusca and Echinodermata. Climate alert: climate change monitoring and strategy University of Sydney Press, Sydney. 2010:142-85.
3. Byrne M. Global change ecotoxicology: identification of early life history bottlenecks in marine invertebrates, variable species responses and variable experimental approaches. Marine environmental research. 2012 76:3-15.
4. Harvell C, Kim K, Burkholder J, Colwell R, Epstein PR, Grimes D, et al. Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. Science. 1999 285:1505-10.
5. Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, et al. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. Science. 2002 296:2158-62.
6. Doney SC, Ruckelshaus M, Duffy JE, Barry JP, Chan F, English CA, et al. Climate change impacts on marine ecosystems. Marine Science. 2012 4.
7. Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C. Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. Microscopy research and technique. 2002 57:469-76.
8. Paillard C. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Aquatic Living Resources. 2004 17:467-75.
9. Flassch J-P, Leborgne Y. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement. Introductions and Transfers of Aquatic species Selected papers from a Symposium Held in Halifax, Nova Scotia, 12-13 June 1990; 1992.
10. Flassch J-P, Barret J, Mazurie J, Maes P, Nicolas J, Noel T, et al. L'élevage de la palourde, programme national de recherche sur la maladie de l'anneau brun. Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture, Brest (France), 9 Nov 1990; 1992.
11. Paillard C, Maes P. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. Comptes rendus de l'Académie des sciences Série 3, Sciences de la vie. 1990 310:15-20.
12. Paillard C, Percelay L, Le Pennec M, Le Picard D. Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). Comptes rendus de l'Académie des sciences Série 3, Sciences de la vie. 1989 309:235-41.
13. Park K-I, Paillard C, Le Chevalier P, Choi K-S. Report on the occurrence of brown ring disease (BRD) in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, on the west coast of Korea. Aquaculture. 2006 255:610-3.
14. Matsuyama T, Sakai T, Kiryu I, Yuassa K, Yasunobu H, Kawamura Y, et al. First isolation of *Vibrio tapetis*, the Etiological Agent of Brown Ring Disease (BRD), in Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. Fish Pathology. 2010 45 (2):77-9.
15. Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT, et al. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. International journal of systematic bacteriology. 1996 46:480-4.
16. Paillard C, Maes P, Oubella R. Brown ring disease in clams. Annual Review of Fish Diseases. 1994 4:219-40.
17. Paillard C, Maes P. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. Journal of invertebrate pathology. 1995 65:91-100.

18. Paillard C, Maes P. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. *Diseases of aquatic organisms*. 1994 19:137-46.
19. Allam B, Paillard C, Ford SE. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis Aquat Org*. 2002 48:221-31.
20. Paillard C. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilitation à diriger des recherches (HDR), Université de Bretagne Occidentale, Brest. 2004.
21. Maes P. Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins d'intérêt commercial, *Ruditapes philippinarum* et *Paracentrotus lividus*. Brest: Université de Bretagne Occidentale; 1992.
22. Haberkorn H. Description des paramètres de croissance, de cytotoxicité et des caractéristiques sérologiques et génétiques d'une souche de *Vibrio* sp. thermotolérante. Rapport de master. Quimper: Université de Bretagne Occidentale 2005.
23. Paillard C, Maes P, Mazurié J, Claude S, Marhic A, Le Pennec M. Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of Atlantic coast: role of temperature in variations of prevalence. *Proceedings of VIIIe Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*; 1997, p. 32.
24. Rinkevich B, Müller WE. *Invertebrate immunology*: Springer-Verlag; 1996.
25. Rodriguez-Lopez JN, Tudela J, Varon R, Garcia-Carmona F, Garcia-Canovas F. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 1992 267:3801-10.
26. Aladaileh S, Rodney P, Nair SV, Raftos DA. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2007 148:470-80.
27. Roulin A, Almasi B, Meichtry-Stier K, Jenni L. Eumelanin- and pheomelanin-based colour advertise resistance to oxidative stress in opposite ways. *Journal of evolutionary biology*. 2011 24:2241-7.
28. Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in immunology*. 2008 29:263-71.
29. Muñoz P, Meseguer J, Esteban M. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish & shellfish immunology*. 2006 20:12-9.
30. Butt D, Raftos D. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Developmental & Comparative Immunology*. 2008 32:299-306.
31. Luna-Acosta A, Saulnier D, Pommier M, Haffner P, De Decker S, Renault T, et al. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish & shellfish immunology*. 2011 31:795-800.
32. Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C, Leboulenger F. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ*. 2005 2:91-104.
33. Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas J-L, Paillard C. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms*. 2003 57:109-16.
34. Jensen S, Samuelsen OB, Andersen K, Torkildsen L, Lambert C, Choquet G, et al. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkscrew wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Diseases of aquatic organisms*. 2003 53:25-31.
35. Choquet G. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise. Brest: Université de Bretagne Occidentale; 2004.

36. Corporeau C, Vanderplancke G, Boulais M, Suquet M, Quéré C, Boudry P, et al. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of proteomics*. 2012.
37. Guévelou E, Huvet A, Galindo-Sánchez CE, Milan M, Quillien V, Daniel J-Y, et al. Sex-Specific Regulation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Biology of reproduction*. 2013:biolreprod. 113.109728.
38. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976 72:248-54.
39. Le Bris C, Paillard C, Stiger-Pouvreau V, Guérard F. Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties. *Fish & shellfish immunology*. 2013.
40. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. In: *Computing RfFS*, editor. Vienna, Austria; 2013.
41. Faria JC, Jelihovschi E, Allaman IB. TukeyC: Conventiounal Tukey Test. R package version 1.1-0. 2012.
42. Solidoro C, Pastres R, Melaku Canu D, Pellizzato M, Rossi R. Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in Northern Adriatic lagoons. *Marine ecology Progress series*. 2000 199:137-48.
43. Flye-Sainte-Marie JG. Ecophysiology of brown ring disease in the manila clam *Ruditapes philippinarum*, experimental and modelling approaches. Brest: Université de Bretagne Occidentale; 2007.
44. Fisher WS. Environmental influence on bivalve hemocyte function. *Am Fish Soc Spec Publ*. 1988 18:225-37.
45. Yang H, Yuan X, Zhou Y, Mao Y, Zhang T, Liu Y. Effects of body size and water temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) with special reference to aestivation. *Aquaculture Research*. 2005 36:1085-92.
46. Chu F-LE, La Peyre JF. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. *Diseases of aquatic organisms*. 1993 16:223-.
47. Liu X, Ji C, Zhao J, Wu H. Differential metabolic response of clam *Ruditapes philippinarum* to *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* challenges. *Fish & shellfish immunology*. 2013.

Conclusion des expérimentations d'infections de *Venerupis philippinarum* par *Vibrio tapetis* CECT4600 et *V. tapetis* LP2 à 15°C et 22°C.

L'objectif de cette série d'expérimentations était d'étudier l'interaction tripartite hôte-pathogène-environnement pendant 30 jours après les infections expérimentales. Dans un premier temps c'est uniquement l'interaction entre l'hôte, *V. philippinarum*, et la bactérie pathogène, *V. tapetis*, qui a été considérée à travers l'infection de palourdes par *V. tapetis* CECT4600 et LP2, deux souches aux pathogénicités considérées contrastées, à une température de 15°C.

Réponse immunitaire tissus et temps dépendante

Les résultats obtenus mettent en avant, dans un premier temps l'importance de considérer les activités enzymatiques volumiques ou spécifiques en fonction de l'enzyme et du tissu étudié. En effet, la relation entre l'activité enzymatique spécifique considérée et le contenu en protéines totales est variable d'un tissu à l'autre et peut entraîner des biais dans l'interprétation des variations d'activités enzymatiques observées. Aussi, le contenu en protéines totales, dans le manteau d'organismes infectés par chacune des deux souches de *V. tapetis*, est significativement plus élevé que dans le manteau des organismes ayant reçu une injection d'Eau de Mer Stérile Filtrée (EMSF) aux temps précoces. Trente jours après les injections, une différence de contenu en protéines totales est également observable dans l'hémolymphe des animaux : celui-ci est plus important chez les organismes injectés avec *V. tapetis* LP2 qu'avec l'EMSF et plus encore que ceux injectés avec *V. tapetis* CECT4600.

Les réponses enzymatiques présentent également des différences en fonction des compartiments étudiés. Ainsi, les activités PO et SOD, dans le manteau des organismes ayant reçu une injection de *V. tapetis*, indépendamment de la souche, sont significativement augmentées par rapport aux individus témoins aux temps précoces. Trois jours après les infections expérimentales, l'activité PO dans le manteau d'animaux infectés par *V. tapetis* LP2 a poursuivi son augmentation et est plus importante que dans le manteau ayant reçu une injection d'EMSF ou de *V. tapetis* CECT4600. La réponse de l'activité SOD dans le manteau est plus tardive et ne permet pas de différencier les deux souches puisque 7 jours après les infections, l'activité SOD des animaux infectés par *V. tapetis* est significativement plus faible que pour les animaux contrôles.

Dans l'hémolymphe, la réponse enzymatique semble plus tardive ou simplement plus diluée spatialement et temporellement parlant au sein des organismes du fait du caractère

circulant de ce fluide. Les infections ayant été pratiquées dans le compartiment extrapalléal des animaux, le manteau est le tissu directement exposé aux bactéries et donc le premier à déclencher une réponse immunitaire par rapport à l'hémolymphe qui circule dans l'ensemble de l'organisme. En effet dans ce compartiment hémolympatique, 7 jours après les infections, l'activité PO des animaux ayant reçu une injection bactérienne est significativement diminuée par rapport aux animaux contrôles. Dans le même temps l'activité SOD des animaux infectés par *V. tapetis* CECT4600 est augmentée par rapport aux autres individus. Cet effet, probablement dû à la pathogénicité de cette souche bactérienne est également observé 30 jours après les injections au niveau de l'activité PO puisque celle-ci est nettement plus élevée pour les animaux infectés par *V. tapetis* CECT4600 que pour les animaux contrôles ou ceux infectés par *V. tapetis* LP2.

Pathogénicité de *V. tapetis*

Deux types d'effet sont observables suite aux infections bactériennes. Le premier est un « effet bactéries », lorsque la réponse n'est pas significativement différente entre les deux souches de *V. tapetis* étudiées mais néanmoins différente des animaux contrôles. Un tel effet est notamment visible dans le manteau, 36h après les infections, tant au niveau du contenu protéique que des activités enzymatiques puisque les niveaux des animaux ayant reçu une injection de bactéries (indépendamment de la souche) sont significativement supérieurs à ceux des animaux contrôles. Un effet similaire est observé pour le contenu en protéines totales, 7 jours après les infections, au niveau des fluides extrapalléaux. Cependant, un « effet souche » peut également être observé et est certainement lié à une différence de pathogénicité entre les deux souches bactériennes. Au niveau de l'hémolymphe, l'injection de la souche CECT4600 est associée à des quantités de protéines totales plus importantes que pour les 2 autres types d'injection de 3 à 14 jours après les infections. Dans ce même compartiment hémolympatique, un tel effet est également visible, à partir de 14 jours après les infections pour l'activité PO et 7 jours après les infections pour l'activité SOD. Ces réponses enzymatiques plus importantes face à CECT4600 suggèrent une virulence plus forte de cette souche par rapport à la souche LP2.

Effet de la température sur l'interaction hôte-pathogène

Le second objectif de cette série d'expérimentations était d'évaluer l'impact du facteur thermique sur l'interaction entre *V. philippinarum* et *V. tapetis* afin de considérer l'interaction tripartite en intégrant un paramètre environnemental. Le conditionnement des animaux à une

température de 22°C par rapport à un conditionnement à 15°C provoque des concentrations en protéines totales plus élevées dans le manteau des animaux, indépendamment des injections pratiquées. Dans l'hémolymph, trente jours après les injections, alors qu'à 15°C le contenu en protéines totales des animaux injectés avec *V. tapetis* CECT4600 est significativement plus faible que pour les autres individus, à 22°C cette différence de contenu protéique s'estompe entre les types d'injections. Tout comme les contenus en protéines totales, les niveaux d'activité enzymatiques, avant les injections, sont également significativement augmentés dans le manteau et l'hémolymph pour l'activité PO et dans le manteau pour la SOD. A 15°C, la différence de virulence entre les deux souches est visible, notamment à travers les activités enzymatiques 30 jours après les injections, dans l'hémolymph et le manteau pour l'activité PO et l'activité SOD respectivement. Cet « effet souche » n'est plus visible à 22°C mais un effet « bactéries » est alors observé pour ces mêmes activités dans ces mêmes compartiments. Ces résultats traduisent une baisse de virulence de la souche CECT4600 et cette baisse est effectivement visible à travers les valeurs de CRS obtenus 30 jours après les infections. Cette baisse de virulence est également visible pour les individus infectés par la souche LP2 mais dans une moindre mesure. En effet, à 22°C, les virulences des deux souches de *V. tapetis* semblent plus ou moins similaires d'une part du fait d'une baisse de la virulence, plus marquée pour la souche CECT4600 mais aussi du fait d'une meilleure réparation de la part des palourdes. En effet les valeurs de SRS confirment le fait que les capacités immunitaires des palourdes japonaises sont meilleures à 22°C qu'à 15°C et ce aussi bien pour les animaux infectés par la souche CECT4600 que pour ceux infectés par la souche LP2.

3. Etude, in vitro, de l'effet des produits extracellulaires de *Vibrio tapetis* sur l'activité phénoloxydase de *Venerupis philippinarum*

3. 1. Introduction

Le micro-organisme pathogène responsable de la Maladie de l'Anneau Brun (MAB), *Vibrio tapetis*, appartient au genre *Vibrio*. Il s'agit, comme tous les vibrions, d'une bactérie mésophile, chimio-organotrophe et anaérobie facultative qui possède deux chromosomes circulaires (Heidelberg *et al.*, 2000 ; Makino *et al.*, 2003). Dans ce chapitre, l'activité phénoloxydase (PO) a été suivie, tout comme l'activité superoxyde dismutase (SOD), chez la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* après une infection par *V. tapetis*. Les activités enzymatiques ont dans ce cas été utilisées comme des biomarqueurs du système immunitaire de l'hôte et les variations de ces activités enzymatiques sont alors interprétées comme participant à la réponse immunitaire à la suite d'infections bactériennes. Cependant, ces expérimentations mettent en avant la complexité de l'interaction entre l'hôte, le micro-organisme pathogène et leur environnement. En effet, le résultat d'une infection par un microorganisme est associé, d'une part à l'équilibre entre la pression de l'infection par le micro-organisme pathogène et, d'autre part, aux processus de neutralisation mis en place par l'hôte (Sindermann, 1990). Pour mieux appréhender le mécanisme infectieux et pour mieux comprendre l'action de l'organisme pathogène sur l'hôte, il est donc indispensable de ne pas se focaliser uniquement sur le système immunitaire de l'hôte. La pression d'infection exercée par l'organisme pathogène peut être étudiée via la sécrétomique qui est l'étude des produits de sécrétion des bactéries et particulièrement des facteurs de virulence (Barbey *et al.*, 2009). Pour un agent pathogène, ces facteurs de virulence sont les différents composants nécessaires à l'expression de sa pathogénicité et notamment, les éléments nécessaires à sa viabilité et à sa multiplication dans son hôte (Casadevall & Pirofski, 1999). Par conséquent, ces facteurs de virulence se révèlent être une cause importante de maladie et de mortalité (Toranzo *et al.* 1983). Ainsi, afin de mieux comprendre le rôle de l'agent pathogène sur le système immunitaire de l'hôte, différentes études se sont particulièrement intéressées aux produits extracellulaires bactériens (ECPs) et notamment aux ECPs de *V. tapetis* dans l'interaction caractérisant la Maladie de l'Anneau Brun (MAB). Ainsi l'injection, dans le muscle adducteur de palourde japonaise, de bactéries mortes ou d'ECPs seuls n'entraîne pas la mort des organismes contrairement à l'injection de bactéries vivantes (Allam *et al.*, 2002). Ce résultat indique que la mort des palourdes, par septicémie est davantage due aux activités des

bactéries vivantes qu'aux facteurs de virulence seuls produits par celles-ci. L'effet de *V. tapetis* a plus particulièrement été étudié au niveau cellulaire sur les hémocytes de *V. philippinarum*. Ainsi, les cellules de *V. tapetis* et ses produits extracellulaires entraînent des changements importants au niveau hémocytaire : une baisse de la viabilité, des capacités de phagocytose et une altération de la taille et de la structure interne des hémocytes (Allam & Ford, 2006). Plus précisément, la baisse de la capacité de phagocytose est liée à un arrondissement des hémocytes et à la non-formation de pseudopodes (Choquet *et al.*, 2003). Les effets de *V. tapetis* ont été étudiés sur d'autres espèces et bien que la bactérie entraîne également la mort des hémocytes de *Mercenaria mercenaria* ou de *Crassostrea virginica*, cette mort cellulaire est quantitativement bien moins importante que chez *V. philippinarum* (Allam & Ford, 2006).

Bien que les effets d'une exposition à des bactéries soient davantage étudiés au niveau cellulaire, différentes études se sont intéressées aux effets provoqués au niveau de l'immunité humorale. Ainsi le parasitisme du lépidoptère *Lacanobia oleracea* par la larve de guêpe *Eulophus pennicornis* entraîne une inhibition de l'activité PO dans l'hémolymphe. Cette inhibition est inexistante avec du venin de guêpe adulte, ce qui traduit une production, de la part des larves de guêpes, de facteurs responsables de l'inhibition de l'activité PO (Richards & Edwards, 2000). En inhibant ainsi l'activité PO de son hôte, la larve d'*E. pennicornis* assure des conditions favorables à son développement et à sa survie au sein de son hôte. Pour *V. tapetis*, certains facteurs de virulence de la souche CECT4600 ont pu être identifiés comme étant des hémolysines, des cytotoxines des exotoxines et des plasmides (Borrego *et al.*, 1996b ; Castro *et al.*, 1997). Chez une autre espèce de *Vibrio*, *V. carchariae* Eml82KL, c'est une protéase à sérine qui a été identifiée, parmi les ECPs, comme responsable de gastroentérites létales chez des espèces de mérous (Lee *et al.*, 2002). Dans le contexte de notre étude, ce résultat s'avère particulièrement intéressant puisqu'il a été démontré que les protéases à sérine interviennent directement dans l'activation des zymogènes de la PO (Kanost *et al.*, 2001 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006 ; Cerenius *et al.*, 2010).

L'objectif de cette étude est de tester l'effet d'ECPs de *Vibrio tapetis* sur l'activité PO d'hémolymphe de palourde japonaise *V. philippinarum*. Plus précisément, les ECPs de 2 souches de *V. tapetis* dont la virulence est forte, dans le cas de *V. tapetis* CECT4600, et plus faible dans le cas de *V. tapetis* LP2, ont été testés sur l'activité PO de palourde.

3. 2. Matériel et méthodes

3. 2. 1. Culture des souches bactériennes

Pour l'expérimentation 2 souches de *V. tapetis* ont été utilisées. La première : *V. tapetis* CECT4600 a été isolée en 1990 à Landéda (Finistère, Bretagne, France) et a été identifiée comme responsable de la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) et des mortalités importantes associées (Paillard *et al.*, 1994 ; Borrego *et al.*, 1996). A ce jour, cette souche de *V. tapetis* est considérée comme la plus virulente (Choquet *et al.*, 2003). La seconde souche étudiée est *V. tapetis* LP2, isolée en 1999 chez le crénilabre *Symphodus melops* en Norvège (Jensen *et al.*, 2003) et qui n'induit pas la MAB lorsqu'elle est inoculée dans la cavité palléale de palourdes japonaises (Choquet, 2004).

La mise en culture des deux souches bactériennes est détaillée dans le matériel et méthodes 2-10-1

3. 2. 2. Produits extracellulaires

La méthode utilisée pour obtenir les ECPs des deux souches étudiées est inspirée des travaux réalisés par Liu et collaborateurs (1957) et est détaillée dans la partie matériel et méthodes 2.10.1.

3. 2. 3. Dosage des protéines totales

La concentration en protéines totales des solutions d'ECPs obtenues a été déterminée par la méthode colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976) détaillée dans la partie Matériel et méthodes 2-3. Une gamme dont les concentrations étaient comprises entre 0,031 et 1mg.mL⁻¹ a été réalisée à partir d'albumine de sérum bovin (BSA).

3. 2. 4. Dosage de l'activité phénoloxydase

L'effet des ECPs des deux souches sélectionnées de *V. tapetis* a été étudié sur du sérum d'hémolymphe de palourde japonaise *V. philippinarum*. L'origine de ces animaux est précisée dans la partie matériel et méthodes 2-1-1.

L'activité PO du sérum d'hémolymphe a été dosée en présence d'ECPs à différentes concentrations. Pour ce faire, les ECPs étaient dilués dans le tampon Tris-HCl (0,1M ; pH 8,2). Le milieu réactionnel était donc composé de 50μL de sérum d'hémolymphe, de 50μL de Tris-HCl contenant les ECPs à différentes concentrations et de 100μL de L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) 0,04M. Pour chaque concentration en protéines totales des solutions d'ECPs testées, des blancs ont été réalisés contenant les réactifs dans les mêmes proportions mais avec 50μL d'eau ultra pure à la place des 50μL de sérum afin de soustraire

l'autooxydation du substrat. L'absorbance des différents échantillons et des blancs correspondants a ensuite été suivie pendant 30 minutes à 492 nm afin de mesurer la transformation du substrat. Le mélange réactionnel sans ECPs est considéré comme représentant 100% d'activité PO et les résultats en présence des ECPs des deux souches, à différentes concentrations, ont été exprimés en activité relative. Pour les échantillons et leurs blancs correspondants, les activités ont été dosées en duplicatas et les valeurs obtenues sont les moyennes de ces duplicatas. Les concentrations testées en ECPs sont synthétisées dans le tableau 10.

Tableau 10. Synthèse des concentrations finales en protéines totales des solutions d'ECPs des souches de *V. tapetis* testées : CECT4600 et LP2.

<i>V. tapetis</i> CECT4600 (μg de protéines.mL ⁻¹)	<i>V. tapetis</i> LP2 (μg de protéines.mL ⁻¹)
207,5	235
175	207,5
150	175
125	150
100	100
75	75
50	50
25	25
0	0

3. 3. Résultats

Les dosages ont mis en avant la reproductibilité de l'expérience puisque les valeurs d'écart-type se sont révélés très faible, voire quasiment nulles. Les résultats obtenus montrent que les ECPs issus des deux souches de *V. tapetis* testées exercent une action inhibitrice sur l'activité PO du sérum d'hémolymphe de *V. philippinarum*. Plus précisément, cette action inhibitrice des ECPs bactériens se traduit par un effet dose (Figure 40).

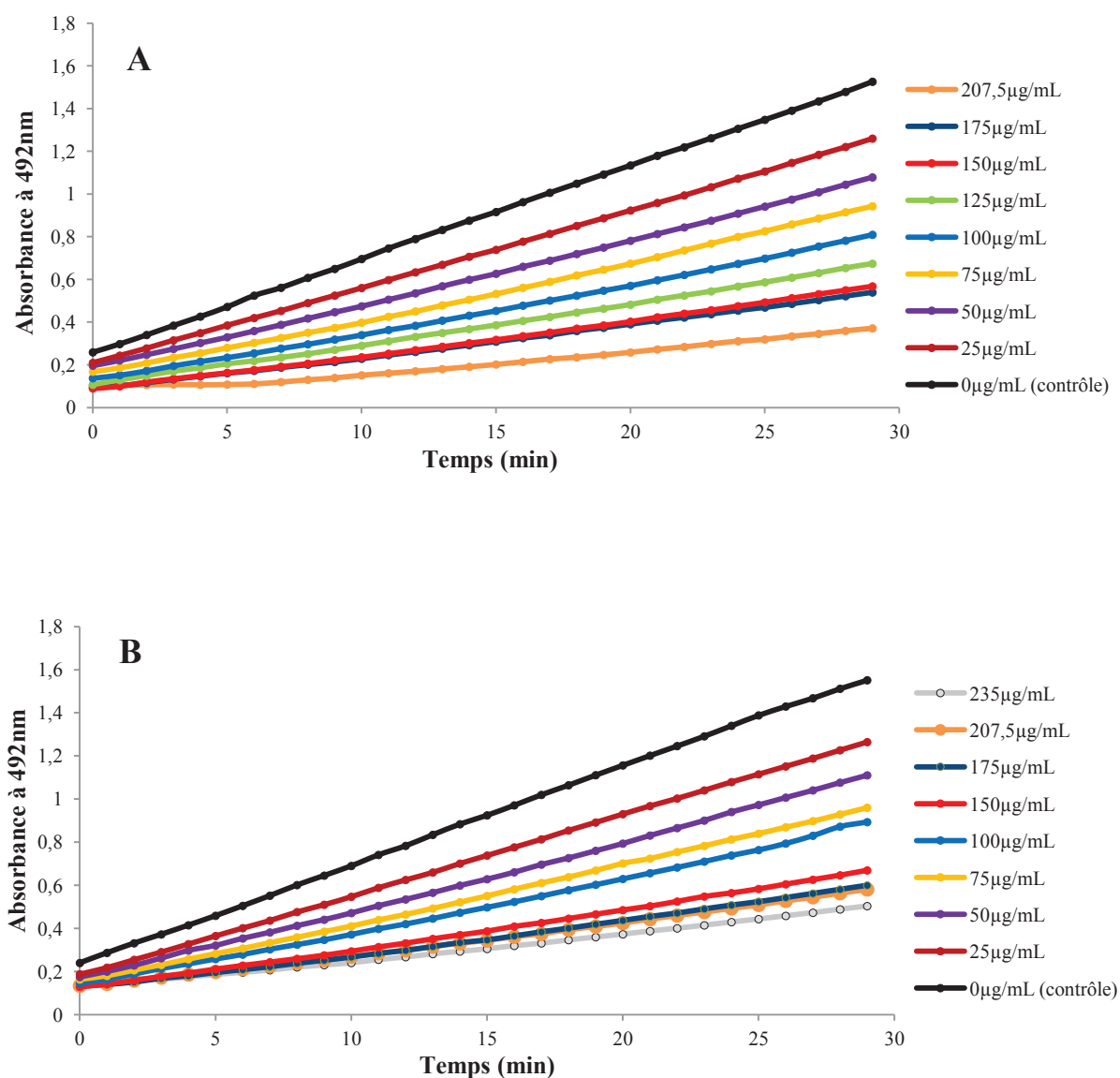


Figure 41. Evolution de l'absorbance corrigée (Absorbances mesurées corrigées de l'absorbance des blancs correspondants), mesurée à 492nm en fonction du temps, pour les différentes concentrations en protéines totales des solutions d'ECPs testées. L'augmentation d'absorbance traduit l'oxydation de la L-DOPA (40mM) par la phénoloxydase. (A) Solutions d'ECPs de *V. tapetis* CECT4600. (B) Solutions d'ECPs de *V. tapetis* LP2.

Aux concentrations testées l'inhibition n'est pas totale, pour aucune des deux souches testées. L'inhibition atteint un maximum de 76,49% pour les ECPs issus de *V. tapetis* CECT4600 à une concentration de 207,5µg.mL⁻¹ et un maximum de 74,0% pour les ECPs issus de *V. tapetis* LP2 à une concentration de 235µg.mL⁻¹ (Tableau 11).

Tableau 11. Pourcentage d'inhibition de l'activité PO en fonction de la concentration finale en protéines totales des solutions d'ECPs pour les deux souches de *V. tapetis* testées : CECT4600 et LP2.

Concentration en protéines totales des solutions d'ECPS de <i>V. tapetis</i> CECT4600 (µg/mL)	Pourcentage d'inhibition	Concentration en protéines totales des solutions d'ECPS de <i>V. tapetis</i> LP2 (µg/mL)	Pourcentage d'inhibition
207,5	76,49	235	74,00
175	69,58	207,5	67,03
150	66,33	175	66,81
125	60,22	150	63,04
100	52,89	100	48,16
75	44,80	75	44,27
50	34,59	50	33,33
25	18,68	25	22,46
0	0,00	0	0,00

3. 4. Discussion

Le succès ou l'échec, pour un organisme hôte, dans la neutralisation d'un microorganisme pathogène dépend d'une part de la virulence de l'agent pathogène et d'autre part de l'efficacité du système immunitaire de l'hôte. Aussi, pour mieux comprendre les mécanismes mis en place au cœur d'une interaction entre un hôte et un organisme pathogène il est possible de se placer du côté de l'agent pathogène ou de l'hôte. Des études se sont déjà intéressées à l'action de la phénoloxydase sur la croissance de bactéries. Ainsi il a été montré que les produits d'oxydation de la dopamine par la PO d'hémocytes de *Chlamys farreri* inhibent la croissance de *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* et d'*Aeromonas salmonicida* mais pas celle de *Streptococcus dysgalactiae* ni de *S. iniae* ni de *Micrococcus lysodeikticus* (Xing *et al.*, 2012). La croissance d'*Edwardsiella tarda* qui, comme les Vibrions et *Aeromonas*, est gram-négative n'est pas inhibée et cela peut être dû au fait qu'*E. tarda* est capable de produire des polysaccharides extracellulaires ayant une forte activité antioxydante et inhibant l'activité PO (Guo *et al.*, 2010). Dans le cas de notre étude nous avons voulu étudier non pas les effets de l'activité PO de l'hôte sur l'agent pathogène mais les effets des produits extracellulaires de la bactérie pathogène sur l'activité PO de l'hôte.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent qu'à travers l'inhibition exercée par les ECPs, les bactéries testées influent directement sur le système immunitaire de l'hôte. En effet l'inhibition de l'activité PO en présence d'ECPs traduit une baisse des capacités immunitaires

ce qui est favorable au développement de la bactérie au sein de la palourde et particulièrement à la fixation et au développement au niveau de la lame périostracale. Autrement dit, pour que la bactérie puisse persister et se développer au sein de son hôte, elle doit se protéger du système immunitaire de celui-ci en modulant les activités enzymatiques immunitaires ou les produits issus des activités de ces enzymes, notamment dans les fluides extrapalléaux périphériques. Les bactéries pathogènes vont notamment agir sur les enzymes antioxydantes régulant la concentration en espèces réactives de l'oxygène (EROs), lesquelles, en temps normal, contribuent à la neutralisation et à l'élimination de l'agent pathogène (Torreilles *et al.*, 1996). Chez le mollusque *Biomphalaria glabrata*, le parasite *Schistosoma mansoni* produit des molécules qui inhibent la phagocytose mais aussi la production d'EROs par les hémocytes (Connors & Yoshino, 1990). En dehors du fait d'inhiber la production d'EROs, certains micro-organismes pathogènes sont capables de neutraliser les EROs produites par l'hôte afin se prémunir des effets délétères de celles-ci. En effet la bactérie *Vibrio anguillarum*, agent pathogène de l'huître américaine *Crassostrea virginica*, produit une catalase qui va détoxifier les EROs produites par l'huître (Bramble & Anderson, 1997). Chez une autre espèce d'huître, *C. gigas*, les ECPs de *V. aestuarianus* 01/32 inhibent significativement les capacités d'adhésion et de phagocytose des hémocytes de l'hémolymphe mais activent la production d'EROs pour des concentrations supérieures à $64\mu\text{g.mL}^{-1}$ de façon dose dépendante (Labreuche *et al.*, 2006). Les ECPs de cette même bactérie, provoquent également une augmentation significative de la production d'EROs de la part des hémocytes du bivalve *Mercenaria mercenaria* (Buggé *et al.*, 2007). A l'inverse, chez la palourde japonaise, une inhibition du métabolisme oxydatif a été observée de la part des hémocytes en présence de cellules bactériennes de *V. tapetis* (Choquet, 2004). Dans la continuité de notre étude, il serait intéressant, parallèlement à la quantification de l'inhibition de l'activité PO, d'estimer la production d'EROs par *V. philippinarum* en présence des ECPs produits par chacune des 2 souches de *V. tapetis*. Cela permettrait d'avoir un aperçu plus général de l'action des ECPs et de mieux comprendre comment la bactérie parvient à se prémunir de l'action du système immunitaire afin de s'établir et de se développer. Si la SOD de l'hôte est impliquée dans la défense contre l'agent pathogène, deux SOD (SodB et SodM) ont également été mises en avant au sein du sécrétome de *V. tapetis* CECT4600 (Madec *et al.*, in prep). Ces enzymes pourraient directement être liées à la virulence de la souche bactérienne en contrant la poussée oxydative qui se produit chez les mollusques bivalves lorsque ceux-ci sont confrontés à un stress biotique et plus précisément exposés à des ECPs bactériens (Labreuche *et al.*, 2006 ; Buggé *et al.*, 2007).

Dans notre étude, l'effet des ECPs totaux ont été étudiés mais pour affiner les résultats obtenus il est possible de séparer les différentes fractions protéiques des ECPs produits par chacune des 2 souches étudiées et de comparer les effets de chacune d'entre elles. En effet, une ultracentrifugation (150 000g pendant 3 heures, à 4°C) des ECPs totaux permet de séparer un surnageant contenant les protéines solubles sécrétées (Soluble Supernatant Proteins : SSPs) et un culot contenant les vésicules membranaires (Outer Membrane Vesicles : OMVs) (Galka *et al.*, 2008). Les effets de chacune de ces fractions pourraient ainsi être différenciés comme cela a précédemment été réalisé avec les molécules sécrétées par la bactérie pathogène pour l'homme *Legionella pneumophila*. Ainsi, il a été montré qu'une grande proportions des protéines des OMVs sont directement impliquées dans la pathogénicité de cette bactérie notamment en modulant, chez l'hôte, l'activité des cytokinines impliquées dans la réponse immunitaire (Galka *et al.*, 2008). Chez *V. tapetis*, les ECPs de la souche CECT4600 ont été purifiés (Madec *et al.*, in prep) mais à ce jour, ceux produits par la souche LP2 ne sont pas connus. La purification et l'identification de ces derniers permettraient de comparer les sécrétomes des deux souches étudiées et de comprendre la différence d'inhibition observée sur l'activité PO de *V. philippinarum* au-delà d'une certaine concentration. Cette comparaison pourrait notamment permettre de savoir si, comme le sécrétome de la souche CECT4600, le sécrétome de la souche LP2 contient 5 chitinases (Madec *et al.*, in prep) qui constituent de bons candidats en tant que facteurs de virulence puisque ces protéines contribuent à la pénétration, la colonisation et à l'attachement de la bactérie dans les tissus de l'hôte (Aguirre-Guzman *et al.*, 2004; Defoirdt, 2010). De plus, la chitine est un composant de la matrice coquillière des mollusques et la présence de 5 chitinases, parmi les ECPs de *V. tapetis* CECT4600, va de paire avec l'inhibition de la synthèse de coquille en cas d'infection de *V. philippinarum* par la bactérie (Paillard, 2004a). Par ailleurs la purification des différents ECPs sécrétés par *V. tapetis* pourrait permettre de tester l'effet de chacun d'eux sur l'activité PO pour comprendre quelle(s) molécule(s) est(sont) responsable(s) de la modulation de l'activité PO observée. L'action des ECPs au niveau du périostacum se traduit par une altération de celui-ci (Paillard & Maes, 1995a), mais pour que le *Vibrio* puisse agir de la sorte il faut que la bactérie ne soit pas éliminée par le système immunitaire de son hôte. L'action inhibitrice des ECPs sur l'activité PO, observée au cours de cette étude, reflète un affaiblissement du système immunitaire, nécessaire pour la bactérie, à son établissement et à sa prolifération, dans un premier temps au niveau de la lame périostacale de la palourde.

Dans notre étude, l'effet des ECPs produits par les deux souches de *V. tapetis* n'ont été étudiés que sur le sérum d'hémolymphe de *V. philippinarum*. Cependant, pour mieux

appréhender l'action de la bactérie sur le système immunitaire de l'hôte il serait intéressant de renouveler l'expérience sur du surnageant de sérum de palourde européenne : *Venerupis decussata*. Cette espèce s'avère en effet, plus résistante à *V. tapetis* et plus efficace quant à limiter la prolifération de celui-ci en son sein (Maes & Paillard, 1992 ; Allam, 1998). Effectivement, suite à une injection de *V. tapetis* dans le muscle adducteur de 10 individus de *V. philippinarum* et 10 individus de *V. decussata*, seulement 2 palourdes japonaises sur 10 sont parvenues à éliminer la totalité des bactéries de leur hémolymphe 3 jours après les injections alors que dans le même temps plus aucune bactérie n'a été détectée dans l'hémolymphe de chacune des 10 palourdes européennes (Allam *et al.*, 2002). La bactérie parvient donc à s'établir dans la palourde japonaise mais n'y parvient pas dans la palourde européenne ce qui peut s'expliquer par l'inhibition, chez *V. philippinarum*, des capacités de phagocytose. Cependant au niveau de la défense humorale, il se peut que l'activité PO de *V. decussata* ne soit pas inhibée de façon aussi importante que celle de *V. philippinarum* par les ECPs de *V. tapetis*. Chez la souche CECT4600, la protéine Ompu identifiée dans le sécrétome pourrait être responsable de la résistance face aux défenses de l'hôte et à la reconnaissance de l'hôte (Madec *et al.*, in prep). Cette protéine pourrait réagir de façon différente face au système immunitaire de *V. decussata* et ainsi expliquer la différence de sensibilité entre les deux espèces. Aussi, l'étude des effets des ECPs de *V. tapetis* sur l'activité PO des deux espèces de palourdes permettrait d'affiner la compréhension de l'interaction entre *V. tapetis* et *V. philippinarum* et plus particulièrement les réactions pathogènes et immunitaires spécifiques entre ces deux espèces.

Chapitre 5 :

Etude comparée de la
pathogénicité de deux souches de
Vibrio tapetis sur des populations
japonaises de
Venerupis philippinarum

1. Introduction

Du fait de son importance économique majeure, la palourde japonaise, *Venerupis philippinarum* est aujourd'hui élevée dans de nombreuses zones du globe et s'est même naturellement établie dans diverses régions où elle a été introduite (Cesari & Pellizzato, 1990 ; Ponurovsky & Yakolev, 1992 ; Laruelle, 1999 ; Mortensen & Strand, 2000 ; Humphreys *et al.*, 2007). Au début des années 70, l'introduction de la palourde japonaise le long des côtes européennes n'a pas été réalisée à partir de stocks natifs de l'espèce, c'est-à-dire de stocks japonais, mais à partir de stocks provenant des Etats-Unis (Flassch & Leborgne, 1992). Les palourdes introduites en France ont été touchées par la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) dès la fin des années 80, ce qui a causé des pertes importantes dans les élevages et a provoqué la fermeture définitive de certains d'entre eux (Paillard, 2004a). A ce jour, aucun épisode de mortalité importante associée à la MAB n'a été signalé le long des côtes Américaines d'où sont issues les palourdes introduites en France. A l'inverse, la MAB a été reportée le long des côtes sud-coréennes et Japonaises, c'est-à-dire dans la zone d'origine de l'espèce (Park *et al.*, 2008). Dans un premier temps, les mortalités importantes ont été associées à des niveaux exceptionnellement élevés de *Perkinsus olseni* (Park *et al.*, 1999 ; Park & Choi, 2001) mais l'hypothèse que ces mortalités importantes soient dues, même en partie, à d'autres organismes pathogènes ne peut être écartée (Park *et al.*, 2006). Ce n'est que récemment, en 2008, que *Vibrio tapetis* a été isolé, au Japon, chez des palourdes présentant les symptômes de la MAB (Matsuyama *et al.*, 2010). La pathogénicité de cette nouvelle souche, *V. tapetis* FPC1121, a été confirmée mais n'a pas été comparée avec celle de souches isolées en Europe.

Ainsi, le premier objectif des ces expérimentations, menées dans le cadre d'un séjour au Japon, est de comparer la pathogénicité relative de deux souches de *V. tapetis*, la première considérée comme la plus virulente, isolée en France en 1989 : CECT4600 (Paillard *et al.*, 1994 ; Maes, 1990 ; Borrego *et al.*, 1996) et la seconde récemment isolée au Japon : FPC1121 (Matsuyama *et al.*, 2010). Ces deux souches bactériennes sont testées sur deux populations différentes de palourdes japonaises, l'une provenant du Nord du Japon et la seconde du Sud du pays. Etant donnée la différence importante de température qu'il peut exister entre ces deux zones d'origine, le facteur « température » pourrait biaiser les résultats obtenus, aussi les infections bactériennes ont été réalisées à deux température différentes. L'avancement de la maladie et de la réparation coquillière, 30 jours après les infections, ont été évalués afin d'estimer d'éventuelles différences de pathogénicité. Parallèlement à ces infections bactériennes, les niveaux de base d'activité phénoloxydase (PO) des deux populations de

palourdes étudiées ont été comparés afin d'évaluer d'éventuelles différences de capacités immunitaires entre ces deux populations de palourdes japonaises cultivées au Japon.

Article 5. Comparison of phenoloxidase basal activity in hemolymph and extrapallial fluids and sensitivity to *Vibrio tapetis* in two *Venerupis philippinarum* populations from Japan

Comparison of phenoloxidase basal activity in hemolymph and extrapallial fluids and sensitivity to *Vibrio tapetis* in two *Venerupis philippinarum* populations from Japan

Cédric Le Bris¹, Tomamasa Matsuyama², Fabienne Guérard¹, Christine Paillard¹.

1 : LEMAR - UMR 6539 – CNRS UBO IRD IFREMER – IUEM – UBO – Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise – Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France.

2 : National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Mie 516-0193, Japan

Abstract

The manila clam, *Venerupis philippinarum*, native to the Indo-Pacific, was introduced, intentionally or unintentionally, in various countries since 1920. The species was introduced in France between 1972 and 1975 but mass mortality events occurred since 1987 and these mortalities were associated with the Brown Ring Disease (BRD) caused by the pathogen bacteria *Vibrio tapetis*. For the first time in 2008, *V. tapetis* was isolated in diseased animals in Japan. The aim of this study was to compare the pathogenicity of this new isolated *V. tapetis* strain (FPC1121) from the CECT4600 strain, isolated in France in 1990 and considered as the most pathogenic *V. tapetis* strain to *V. philippinarum*. The pathogenicity of both strains was studied, through Conchiolin Deposit Stage (CDS) and Shell Repair Stage (SRS), on two different clam populations. The first population came from Akkeshi in the north of Japan, and the second one came from Matsusaka in the south of Japan. Clam immune abilities were also investigated through the phenoloxidase (PO) activity. Different susceptibility and resistance to *V. tapetis* were observed between the 2 studied populations: clams from Matsusaka appeared more sensitive to *V. tapetis* and CECT4600 strain was more virulent than FPC1121 strain. Even if their mean PO level activity was lower than for Matsusaka population, clams from Akkeshi did not appear sensitive to *V. tapetis*, independently of the *V. tapetis* strain injected. This clam population from Akkeshi requires further studies and may represent a solution to BRD in Europe.

Keywords : *Venerupis philippinarum*; *Vibrio tapetis*; Phenoloxidase; Brown Ring Disease; resistance

1. Introduction

The manila clam, *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeves, 1850) is native to the Indo-Pacific and more precisely its original distribution area ranged from Kuril Island in the northern Pacific to Pakistan in the Indian Ocean. Today, natural populations can also be found along north-west coasts of United States, along Atlantic, Adriatic and Mediterranean coasts of Europe and along Mediterranean coasts of Africa (Bourne, 1982; Cesari and Pellizzato, 1990; Humphreys et al., 2007; Laruelle, 1999). The distribution area of this species has grown considerably in less than a century because of many intentional or unintentional introductions in different countries. In 1920, *V. philippinarum* was firstly introduced in Hawaii in order to diversify aquaculture activities (Yap, 1977) and then accidentally along north-west coasts of United States where natural populations have settled (Bourne, 1982). Clams introduced in Europe did not come from the species native area but from United States and these introductions were motivated by aquaculture purposes (Flassch and Leborgne, 1992; Paillard, 2004b). In fact, *V. philippinarum* has higher growth rate than the European carpet shell, *Venerupis decussata* (Linné, 1758) even if its optimal growth temperature ranges from 20 to 24°C (Solidoro et al., 2000). In France, the introduction of this species has increased clam production to reach an annual production of 550 tonnes in 1987. However, mass mortality events occurred in the first French production site in Landéda (Finistère – Brittany) between spring and summer 1987 (Flassch and Leborgne, 1992; Paillard and Maes, 1990). These mortality events were associated with a brown deposit of conchiolin on the peripheric inner surface of the shell and this symptom has given to the disease its name: Brown Ring Disease (BRD; Paillard et al., 1989). Since 1987, BRD, associated with high mortalities, has spread along French coasts and then along European coasts (Goulletquer, 1989; Paillard, 2004a; Robert and Deltreil, 1990). The etiological agent was isolated in 1989 in France: a bacterium first named *Vibrio* Predominant 1 (VP1) and then renamed *Vibrio tapetis* (Borrego et al., 1996; Paillard et al., 1994). Since the appearance of the BRD along European coasts, various *V. tapetis* strains have been isolated and identified in France (Maes, 1992a; Paillard, 1992), England (Allam et al., 2000; Reid et al., 2003), Italy, Spain (Castro et al., 1992) and Norway (Jensen et al., 2003). These strains have been isolated in *V. philippinarum* but also in other mollusks such as *V. decussata*, *Polititapes virgineus* and *Dosinia exoleta* and also in fish species like *Hippoglossus hippoglossus* and *Symphodus melops* (Jensen et al., 2003; Reid et al., 2003). CECT4600 strain, isolated during the first mortality events in Brittany, is, to date, the most pathogenic strain of *V. tapetis* (Choquet et al., 2003). The disease spread is mainly

due to organism transfers for aquaculture purposes but, to date, BRD outbreak has never been reported along coasts of the United States or Canada where *V. philippinarum* is also cultivated for many years (Paillard et al., 1994). BRD signs in manila clams have also been reported in South Korea (Park et al., 2006) and in Japan (Park et al., 2008) but the etiological agent, *V. tapetis*, was not isolated during these mortalities. In May 2008, for the first time, *V. tapetis* was isolated from diseased clams outside of Europe, in Hyogo Prefecture, in Japan (Matsuyama et al., 2010). The pathogenicity of this new strain, FPC1121, was confirmed injecting this strain in healthy clams in which BRD was induced. BRD distribution in Japan and more generally in the Pacific Ocean is still uncertain and further studies are necessary to understand BRD impact on clam populations and also to compare the pathogenicity of the new isolated strain from those isolated along the European coasts.

The aim of our study was to compare the pathogenicity of FPC1121 strain, isolated in Japan, from the CECT4600 strain, isolated in France in 1990 on Japan clam populations. Given the ocean temperature heterogeneity along the Japanese coasts we have chosen to work at 2 different temperatures (i.e. 15 and 20°C) and with 2 clam populations (i.e. the first one came from northern Japan and the second one from southern Japan). Thirty days after *V. tapetis* injections, pathogenicity of both strains were evaluated through Conchiolin Deposit Stage (CDS) and Shell Repair Stage (SRS) according to the classification developed by Paillard & Maes (1994). In addition, comparison of the immune capacity of the 2 clam populations was investigated through the activity of a key enzyme of the immune system, the phenoloxidase (PO). In fact POs have a role in melanisation, in self/non-self recognition, in phagocytosis and in nodule formation (Butt and Raftos, 2008; Cerenius et al., 2010; Söderhäll and Cerenius, 1998; Xing et al., 2012). Thus, the basal PO activities (i.e. in non-exposed to bacteria individuals) were compared between the 2 study populations.

2. Material and methods

2. 1. Experimental animals

In these experiments, 2 clam populations were studied and both came from a part of the native repartition area of the species. The first population came from Matsusaka situated in the south of Honshu Island, which is the main island of the Japanese archipelago (Fig. 1). The second population came from the island's northernmost of the four main islands of the Japanese

archipelago: Hokkaido and more precisely from Akkeshi which is located on the East cost of the island. These animals were acclimated for one week before being sampled. When clams were sampled, the sea water temperature on the sampling sites was 8°C and 22°C in Akkeshi and Matsusaka respectively (Mie Prefecture Fisheries Research Institute, Laboratory of Satellite Oceanography – Division of Marine Bioresource and Environmental Science). Clam lengths were 34.24 ± 1.63 mm and 41.77 ± 2.70 mm (mm \pm SD) in Matsusaka and Akkeshi respectively. Clams from Matsusaka were characterized by a Zebra pedigree whereas animals from Akkeshi were characterized by a white one.



Fig. 1. Map of Japan showing the native sites of both studied *V. philippinarum* populations. A: Akkeshi, B: Matsusaka. Source: Maximilian Dörrbecker

For all experiments, more than 700 clams from each population were transferred to Nansei station (Station of National Research Institute of Aquaculture – 422-1 Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan). Individuals (N=30) from Akkeshi were held in a 50L tank with running aerated water at 15°C. Similarly, individuals (N=30) from Matsusaka were held in a 50L tank with running aerated water at 20°C. The temperature difference between these 2 tanks was due to the temperature difference between the origin areas of the 2 populations. Remaining clams of each population were divided in different tanks, at different temperatures. For each tested temperature and population, 3 conditions were tested. A third of the clams, used as control, received sterile sea water (SSW) injections, another third received *V. tapetis* FPC1121 injections and the last third received *V. tapetis* CECT 4600 injections. Clams (N=110) were acclimated in each tank (see Fig. 2 for details) for a week prior to experiments.

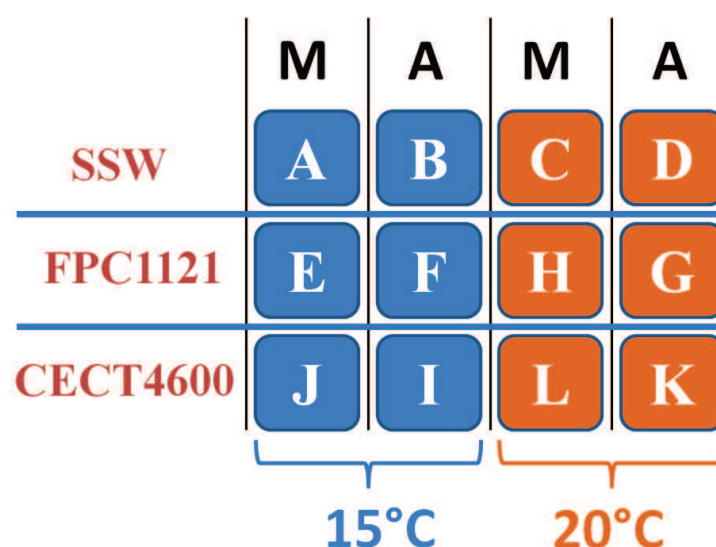


Fig. 2. Clam distribution in 50L tanks (A to L) in regards to their original area (M: Matsusaka; A: Akkeshi), acclimation temperature (15°C or 20°C) and received injections (SSW: Sterile Sea Water for tanks A, B, C and D, FPC1121: *Vibrio tapetis* FPC1121 for tanks E, F, H and G, CECT4600: *Vibrio tapetis* CECT4600 for tanks J, I, L and K). N=110 in each tank.

2. 2. Fluid and tissue collection

To compare the basal PO activity level, i.e. in clams which did not undergone any bacterial challenge, hemolymph, extrapallial fluids and mantle of 30 animals from each population were collected. Hemolymph of each sampled clam was withdrawn from the posterior muscle, through the hinge and centrifuged at 785g for 10 minutes at 4°C to separate hemocytes from serum. After hemolymph collection, the extrapallial fluid (EPF) was collected in each valve, by opening the valves and inserting a needle, fitted on a sterile syringe, between the mantle and shell. The EPF was then centrifuged at 785g for 10 minutes at 4°C to separate cellular and acellular fractions. Enzymatic and protein assays were done on the hemolymph and EPF serums which were stored at -80°C until their use.

After fluid collections, both right and left mantles were dissected. Mantle samples were stored at -80°C until grinding. Mantles were individually ground in 1mL lyse buffer (Tris-HCl 0.1M, NaCl 0.45M, MgCl₂ 0.026M, CaCl₂ 0.01M) using micro-pestle. After this coarse grinding, the samples were centrifuged at 10 000g for 10 minutes at 4°C. Protein and enzymatic assays were done on the mantle lysate supernatant.

2. 3. Protein determination

The total protein content of hemolymph, extrapallial fluids and mantle lysate supernatant (MLS) were determined by the Bradford method (Bradford, 1976) using Quick Start Bradford Protein assay (BioRad Japan). To 5 μ L of enzymatic solution (serum or MLS) 250 μ L of BioRad reactive were added and let in incubation at ambient temperature for 15min before absorbance reading at 595nm. Reaction mixture absorbances were read, using 96-well microplate, with a Sunrise – Tecan microplate reader. Bovine serum albumin (BSA) was used as the protein standard.

2. 4. Assay for phenoloxidase activity

During these experiments, PO was totally activated after freezing at -80°C. The use of SDS (0.1%) did not change the level of PO activity (data not shown) that is why no activator was used during this study. For all PO assays, 2 different substrates were used. The first one is the most commonly used substrate: L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) which is common to the three PO subclasses (i.e. Tyrosinases, Catechol oxidases and Laccases). The second substrate used to assay PO activity was a Laccase specific substrate i.e. Hydroquinone. PO activity was assayed spectrophotometrically in 96-well microplates (Greiner 96-F-bottom) according to the protocol of Le Bris et al. (2013). Briefly, 50 μ L Tris-HCl buffer (0.10 M, pH 8.2) were added to 50 μ L of HL, and this mixture was incubated for 10 minutes at 25°C. Then, 100 μ L substrate was added to each well. Substrate solution concentrations were equal to 0.04 and 0.025M for L-DOPA and Hydroquinone respectively. The plate was quickly mixed and placed in the microplate reader (Wallac Arvo SX) to measure absorbance (A) at 25°C immediately after adding the substrates. Absorbance was read at 490nm to detect the oxidation of L-DOPA and at 390nm to detect the oxidation of Hydroquinone. PO activity was then monitored for 30 minutes following the increase of absorbance at the substrate-specific wavelength. At the same time, the spontaneous oxidation of each substrate was measured by replacing enzymatic solution with pure water in blank runs, and the values thus obtained were subtracted from test values. Each sample and control was tested in triplicate. PO activity was estimated based on the increment in the rate of absorbance (A) per minute obtained from the slope of the linear region from the plot of absorbance on time. The PO specific activities were expressed in arbitrary Unit (U) per milligram of total protein and were obtained as following:

$$\text{PO specific activity (U.mg protein}^{-1}\text{)} = (\Delta A.\text{min}^{-1} \times \text{dilution factor}) / \text{Total protein concentration}$$

2. 5. Bacterial strains and experimental injections

In our experiments, 2 *Vibrio tapetis* strains were used. The first one was *V. tapetis* CECT4600 which was isolated from diseased *V. philippinarum* in 1990 in Brittany in France (Borrego et al., 1996; Paillard et al., 1994). The second *V. tapetis* strain used was *V. tapetis* FPC1121, isolated from diseased *V. philippinarum* in 2008 in Japan (Matsuyama et al., 2010). These strains were grown in Zobell's medium at 18°C. Clams from both origin sites and acclimated at different temperatures received 3 kinds of injection and these injections were done into the pallial cavity. A third of animals received 100µL SSW. A third of clams received 100µL *V. tapetis* CECT4600 solution injections (10^7 CFU.mL⁻¹). The last third of clams received 100µL *V. tapetis* FPC1121 solution (10^7 CFU.mL⁻¹).

2. 6. Microparasites diagnosis

2. 6. 1. Trematodes

Before diagnosing the BRD it was important to estimate the trematode prevalence. The clam infection by trematodes was estimating on the inner shell distinguishing animals with inner shell highly, moderately or weakly infected (Bartoli, 1974; Paillard and Maes, 1995). This estimation of the infection by trematodes was done on 100 clams of each population. While no trematode have been observed on clams from Matsusaka, only 10 clams from Akkeshi show no sign of infection on their inner shells whereas 45 clams had inner shells weakly infected, 38 moderately infected and 7 clams had inner shells highly infected.

2. 6. 2. Classification of BRD syndrome

Thirty days after the injections, all the clams were scarified, their tissues were removed and the shells were kept in order to do the BRD diagnostic to the classification developed by Paillard & Maes (1994). Two index values were established for each diagnosed shell, the first one is CDS (Conchiolin Deposit Stage) which takes into account the extent, location and thickness of the conchiolin deposits. The second index value is SRS (shell repair stages) which reflects the recovery of conchiolin deposit by calcified layers. The CDS values could vary from 0 (asymptomatic clams) to 7 and SRS values from 0 (no repair) to 3 (totally repair). BRD diagnostic was also done on 100 non-injected clams from both populations to compare the natural prevalence of BRD in the two populations.

2. 7. Statistical analysis

Total protein contents and phenoloxidase basal activity levels were compared between populations, for each tested compartment, using Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) test. Tests were performed using STATGRAPHIC Plus 5.1.

For BRD diagnostic analyses, i.e. CDS and SRS which are categorical data with more than 2 levels, a multinomial logistic regression was performed using the ‘multinom’ function of R software. The model used for this analysis considered the clam number in each class of CDS or SRS as a function of temperature, injection condition, population and their first order interaction. The significant differences for each parameter and first order interaction were calculated using likelihood ratio (LR) tests. BRD natural prevalence was compared between the two populations using Fisher test. These analyses were performed with R, version 2.15.3; (Team, 2013) using the following packages: “nnet” (Venables and Ripley, 2002) and “car” (Fox and Weisberg, 2011).

3. Results

3. 1. Total protein contents

In extrapallial fluids, the average protein content was significantly higher ($p < 0.01$) in clams from Matsusaka than in organisms from Akkeshi (1.01mg.mL^{-1} and 0.69mg.mL^{-1} respectively). In contrast, in mantle lysate supernatant, the protein content of organisms from Akkeshi was significantly higher ($p < 0.01$) than in those from Matsusaka (13.75mg.mL^{-1} and 7.95mg.mL^{-1} respectively). In hemolymph supernatants, no significant differences were observed between the 2 populations ($p > 0.01$).

3. 2. Phenoloxydase specific activity

The average basal specific activities were greatly higher in both fluids (i.e. hemolymph and EPF serum) than in mantle lysate supernatant using L-DOPA as well as hydroquinone as substrate. This result could be explained by significantly higher total protein concentrations in mantle lysate supernatant than in fluids ($p < 0.01$).

3. 2. 1. On L-DOPA

L-DOPA, which is the most commonly used substrate to measure PO activity, is common to the 3 PO subclasses. In hemolymph serum, the average activity level was significantly higher ($p < 0.01$, Fig. 3.) in animals from Matsusaka than in those from Akkeshi ($3.83\text{U.mg protein}^{-1}$ and $2.02\text{U.mg protein}^{-1}$ respectively). In contrast, in EPF serum, mean average PO activity is

significantly higher ($p < 0.01$, Fig. 3.) in organisms from Akkeshi than in individuals from Matsusaka ($2.49\text{U.mg protein}^{-1}$ and $1.74\text{U.mg protein}^{-1}$ respectively). Even if the mean specific activity levels were lower than in other compartments there was a significant difference ($p < 0.01$, Fig. 3.) between both populations in mantle lysate supernatant. More specifically, the average specific activity level in clams from Matsusaka was more than four times higher than in clams from Akkeshi ($0.12\text{U.mg protein}^{-1}$ and $0.51\text{U.mg protein}^{-1}$ respectively).

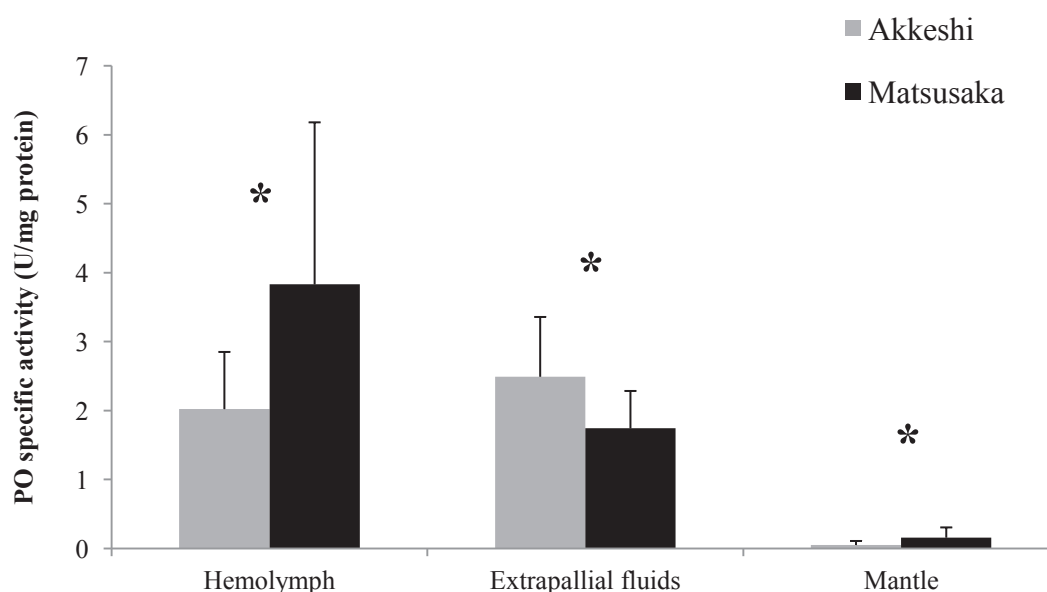


Fig. 3. PO Specific activity in different compartments of clams from Akkeshi and Matsusaka using L-DOPA as substrate. Values are the means of 30 organisms \pm S.D. (* $p < 0.01$).

3. 2. 2. On hydroquinone

Hydroquinone is a laccase specific substrate and the PO specific activity levels were lower using it than using L-DOPA as substrate. The trends observed, using L-DOPA, were confirmed using hydroquinone even if the difference between both populations was not significant in EPF ($p > 0.1$, Fig. 4.).

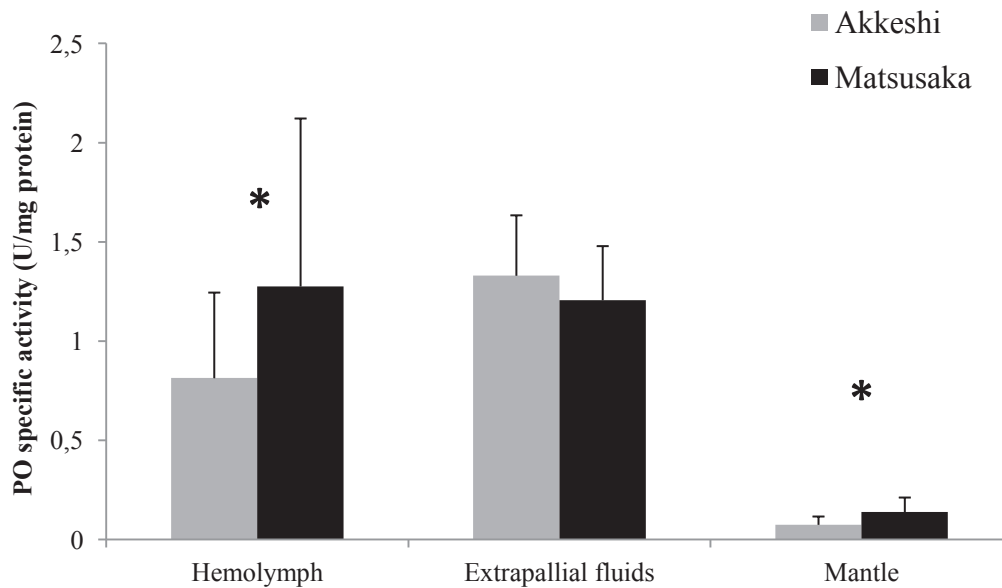


Fig. 4. PO Specific activity in different compartments of clams from Akkeshi and Matsusaka using Hydroquinone as substrate. Values are the means of 30 organisms \pm S.D. (* $p < 0.01$).

3. 3. Brown ring disease diagnosis

Prior to BRD diagnostic on clam shell, animals were scarified and tissues were removed. Once the shells were emptied of their flesh, a high trematode prevalence was found on the inner shell of animals from Akkeshi. Careful consideration was given on these animals to distinguishing BRD symptoms to trematode encapsulation signs. These trematodes were totally absent in animals from Matsusaka.

BRD diagnostic was done according to the classification developed by Paillard & Maes (1994). Two index values were established: CDS (Conchiolin Deposit Stage) and SRS (shell repair stages).

3. 3. 1. Natural prevalence of BRD

The prevalences of Brown Ring Disease were compared between both populations through the Conchiolin Deposit Stages (CDS) of 100 individuals for each population (Tab. 1).

Tab. 1. Number of non-injected clams for each Conchiolin Deposit Stage (CDS), for both populations.

	Healthy	CDS1	CDS2	CDS3	CDS4	CDS5
Matsusaka	75	19	2	2	1	1
Akkeshi	100	0	0	0	0	0

CDS distribution was significantly different ($p=1.15.10^{-7}$) between both populations.

3. 3. 2. Conchiolin Deposit Stage (CDS) in injected clams

CDS takes into account the extent, location and thickness of the conchiolin deposits and its values could vary from 0 (asymptomatic clams) to 7. A significant effect of population ($\chi^2=462.80$, $p=2.20.10^{-16}$), injection ($\chi^2=42.98$, $p=8.64.10^{-5}$) and temperature ($\chi^2=29.40$, $p=1.23.10^{-4}$) were observed for CDS. A significant population and injection interaction ($\chi^2=31.37$, $p=4.92.10^{-3}$), a significant population and temperature interaction ($\chi^2=19.51$, $p=6.73.10^{-3}$) and a significant injection and temperature interaction ($\chi^2=52.50$, $p=2.30.10^{-6}$) were also observed.

CDS values were compared according to the different injections, for a given population, firstly at 15°C and then at 20°C (Fig. 5).

For animals from Matsusaka, acclimated at 15°C, each kind of injection led to different CDS distribution. Thus SSW injected animals exhibited lower stages than FPC1121 and also lower than CECT4600. Between the 2 pathogenic strains, at 15°C, CECT4600 appeared more virulent than FPC1121 as CDS values are generally lower. When water was 5°C hotter the CDS distributions were quite different for each injection condition. In fact BRD stage distributions were different for SSW and FPC injected animals. EMSF and CECT4600 injected organisms exhibited different CDS distribution but this difference was not important. Moreover, there was no difference in CDS distribution between both *V. tapetis* strains. The overall proportion of healthy clams was higher for animals acclimated at 20°C than those acclimated at 15°C for Matsusaka population.

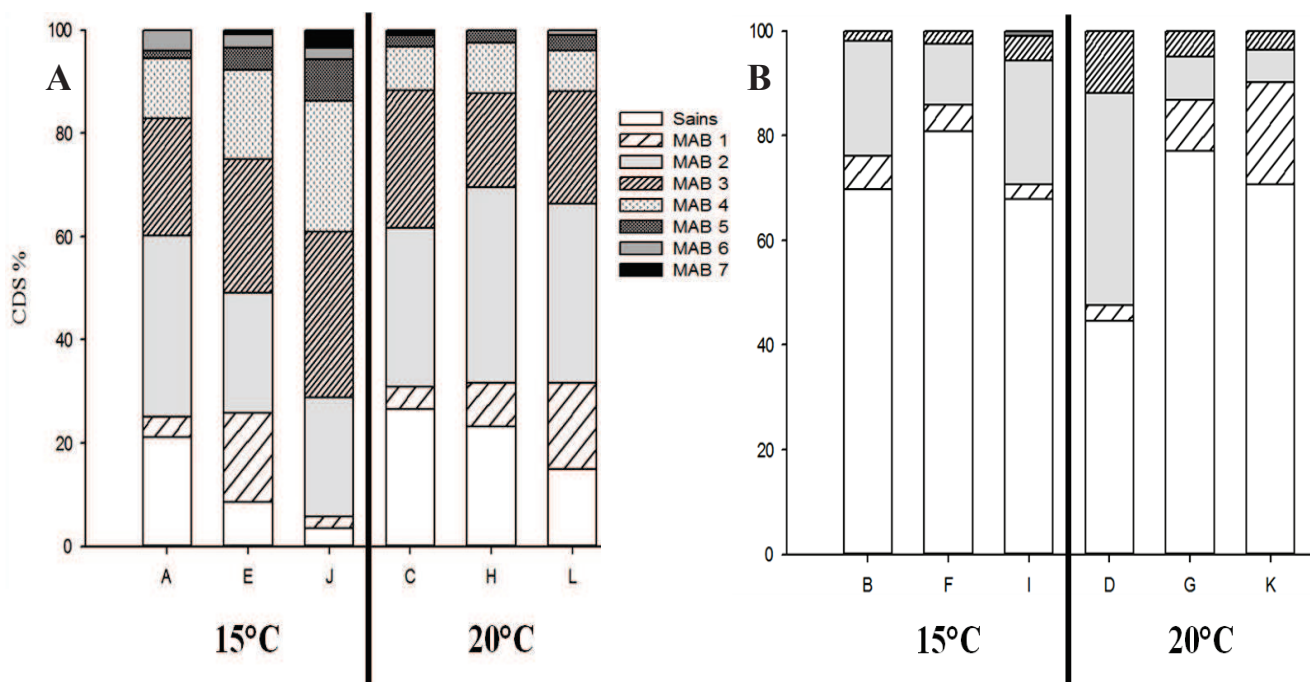


Fig. 5. Percentages of individuals by stage of disease (CDS) based on different tanks for Matsusaka population (A) and Akkeshi population (B).

For animals from Akkeshi, 30 days after the injections, the proportions of healthy clams were much higher than in animals from Matsusaka. For animals acclimated at 15°C, the CDS distributions were not different for any condition. Animals from Akkeshi did not seem as sensitive as organisms from Matsusaka to both pathogenic strains. Results obtained for animals acclimated at 20°C confirmed the feature of Akkeshi population. In fact, SSW injected animals exhibited CDS distribution different from FPC1121 injected animals and also from CECT4600 injected animals but the CDS values were lower for SSW injected animals than for both strain injected animals. As for animals acclimated at 15°C, there was no difference in BRD stages distribution between the 2 kinds of bacterial injection for animals acclimated at 20°C.

3. 3. 3. Shell Repair Stage (SRS) in injected clams

SRS takes into account the recovery of conchiolin deposit by calcified layers and its values could vary from 0 (no repair) to 3 (totally repair). A significant effect of population ($\chi^2=37.86$, $p=3.03 \cdot 10^{-8}$), injection ($\chi^2=20.61$, $p=2.15 \cdot 10^{-3}$) and temperature ($\chi^2=47.57$, $p=2.63 \cdot 10^{-10}$) were observed for SRS. A significant population and injection interaction ($\chi^2=14.00$, $p=2.95 \cdot 10^{-3}$) and a significant injection and temperature interaction ($\chi^2=28.28$, $p=8.31 \cdot 10^{-5}$) were also observed for SRS but no significant population and temperature interaction ($\chi^2=7.10$, $p=6.88 \cdot 10^{-2}$) was observed.

As for CDS, SRS values were compared according to the different injections, for a given population, firstly at 15°C and then at 20°C (Fig. 6).

For Akkeshi population, the repair stages distribution was different between SSW injected animals and FPC1121 injected ones. In fact SRS were higher for animals which received SSW injections than for those which received FPC1121 injections. The difference with animals which received CECT4600 was less important. Moreover, the difference in SRS distribution between both strain injections was not significant ($p=0.1$). For animals acclimated at 20°C the repair abilities were quite the same as the only difference which was between EMSF injected animals and CECT injected ones. Overall, the repair appeared better at 20°C than at 15°C since the proportions of SRS 2 and SRS 2.5 were more important at the expense of SRS 1.

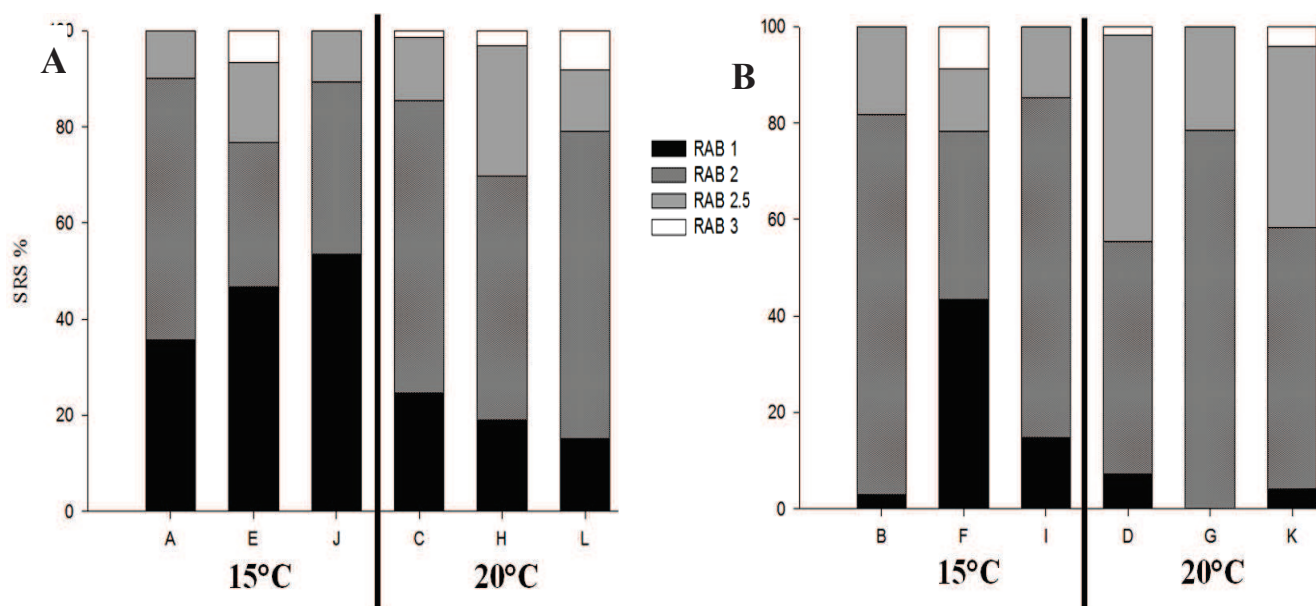


Fig. 6. Percentages of individuals by stage of repair (SRS) based on different tanks for Matusaka population (A) and Akkeshi population (B).

For animals from Matusaka, there were larger differences in SRS distributions. For animals acclimated at 15°C SRS were higher for SSW injected clams compared to FPC1121 injected animals and these ones had SRS higher than CECT4600 injected clams. For animals acclimated at 20°C the repair abilities seemed better because SRS values were higher for each kind of injection. There was no difference in SRS distribution between SSW and FPC1121 injected animals but SRS distributions were different from FPC1121 injected clams to CECT4600 injected animals and also from SSW injected clams to CECT4600 injected organisms.

Discussion

Vibrio bacteria are known to be responsible for many diseases in many animal species. For instance, in humans, *V. parahaemolyticus* causes gastroenteritis related to the ingestion of mollusks, crustaceans or raw fishes (Makino et al., 2003). *V. vulnificus* is responsible for severe infections that may lead to death in less than 48 hours after ingestion of contaminated shellfishes (Johnston and Brown, 2002). The *Vibrio* genus also causes numerous diseases in marine invertebrates and among these diseases the Brown Ring Disease (BRD) is known to be responsible for important mortality events in *V. philippinarum* populations since 1987. In

France, since the BRD appearance some activities have been undertaken in order to obtain clams less sensitive to *V. tapetis* and owning better shell repair abilities (Jeffroy, 2011; Trinkler et al., 2010). These experiments, conducted with SATMAR (Société ATLantique de MARiculture – private farm, Marennes, France), started when cultivated stocks exhibited differential sensitivity to BRD in the gulf of Morbihan (Brittany, France) (Soudant et al., 2004). Production of two-parent families, from this more resistant stock, was done to understand the genetic basis of this resistance on disease (Jeffroy, 2011). Comparable selections have been undertaken, in France, for the oyster *Crassostrea gigas*, suffering of mass mortality events during summer. These studies, associated with MOREST and BIVALIFE programs, selected oysters resistant to summer mortalities and this resistance appeared hereditary (Cochennec-Laureau et al., 2011; Samain and McCombie, 2008). In Australia, similar selection programs have been undertaken for the oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) affected by QX disease. These selection programs of more resistant oysters led to select population with PO activity levels significantly higher than non-selected populations (Newton et al., 2004). More precisely, results obtained during this selection program underlined the fact that one PO isoform was negatively selected in resistant animals (Bezemer et al., 2006). This resistance heterogeneity between populations is not only influenced by animal genotype but also by the environmental factor. For example, in *V. philippinarum*, repair abilities, for a same clam population, appeared better at 21°C than at 8°C or 14°C after infection by *V. tapetis* CECT4600 (Paillard et al., 2004). Moreover, thermal factor also influences the growth and the pathogenicity of the bacteria (Paillard et al., 1997). In this context, this study focused on this host-pathogen interaction in the origin area of *V. philippinarum*.

One of the 2 objectives of this study was to compare baseline levels of PO activity in Manila clams living in the origin area of distribution of the species. In order to assay PO activity, 2 substrates were used in this study. The first one, L-DOPA, is common to the three PO subclasses (i.e. Tyrosinases: E.C1.14.18.1, Catechol oxidases: E.C. 1.10.3.1 and laccases: 1.10.3.2) whereas the second one, Hydroquinone, is a laccase-specific substrate. For a given compartment and a given population the PO specific activity levels are quite different with the 2 substrates. In fact, PO specific activity levels, measured using L-DOPA are generally higher than using Hydroquinone. These differences could be explained by some differences in PO affinity for each substrate and are confirmed by results obtained characterizing PO activity in hemolymph of *V. philippinarum*. In fact, using French manila clam population, it has been

proven that K_m value of PO from hemolymph supernatant was equal to 3.75mM for L-DOPA whereas it was equal to 4.17mM for Hydroquinone (Le Bris et al., 2013).

For hemolymph serum and mantle lysate supernatant and for both substrates the basal PO specific activity was significantly higher in animals from Matsusaka than in clams from Akkeshi. It may therefore be assumed that immune abilities are better for animals from Matsusaka. However, in these clams, the natural BRD prevalence was significantly higher than in animals from Akkeshi so this higher enzymatic activity level could reflect a response to infection. This higher PO activity level could be interpreted as a stronger immune potential only if the BRD prevalence had been the same in both populations. Even if the difference was not significant using hydroquinone, the trend was reversed in extrapallial fluids between both populations. These higher activities in extrapallial fluids could be linked to the presence of trematodes on the inner shell of animals from Akkeshi. In fact, the extrapallial fluids are directly in touch with the shell infected areas so these higher PO activity levels may reflect the immune response to fight against the parasite invasion. It has already been shown that clam parasitism by trematodes could induce organic deposit similar to BRD deposits (Paillard et al., 1994). These brown deposits probably contain melanin derivatives and so directly involve PO action. In *Crassostrea virginica*, lysozyme activity increased in animals infected by a trematode (Feng et al., 1970) so we could hypothesize that other immune enzyme, as PO, follow the same trend.

The population effect, observed for both CDS and SRS, was not so surprising given the difference between these 2 populations, including their morphological and pedigree differences. While clams from Matsusaka exhibited zebra pedigree on the external shell and had a mean shell length of 34.24mm, the clams from Akkeshi exhibited white pedigree and a mean shell length of 41.77mm. This significant visible difference between the 2 populations could explain visible effects in sensitivity and resistance to *V. tapetis*. More precisely, *V. harveyi* induced more severe disruption in energy metabolism and more immune stress in White clams than in Zebra clams (Liu et al., 2013). This study critically underlined the need to consider biological differences in pedigrees in immunity studies to successfully compare populations.

There was also a significant effect of injection on both CDS and SRS which highlights that each type of injection had different effects on clam immune system. Nevertheless, the significant temperature effect was not surprising because the 2 populations have different thermal history.

This study also aimed to evaluate the relative pathogenicity of FPC1121 and CECT4600 strains. Similar injections were done in animals acclimated at 2 different temperatures: 15 and 20°C and from 2 different Japan areas. Concerning strain pathogenicity, both FPC1121 and CECT4600 strains were less pathogenic at 20°C than at 15°C in animals from Matsusaka. FPC1121 strain thermal optimum has not been determined yet but CECT4600 strain's one is known to be around 20°C (Haberkorn, 2005; Maes, 1992b). Therefore, if CECT4600 strain's pathogenicity appeared less important at 20°C than at 15°C, this could be explained by a greater immune capacities of clams facing *V. tapetis*, at 20°C than at 15°C and hence the bacteria appeared less pathogenic. More precisely, whereas at 20°C there were few or no significant differences between the three kinds of injection, at 15°C results indicated that CECT4600 strain is more pathogenic than FPC1121's one and both of them induced CDS higher than SSW injections. These results are in accordance with the work of Paillard and collaborators (2004) who showed that immune response, such as total counts, lysozyme and leucine aminopeptidase activities were higher at 21°C than at 14°C. FPC1121 is a new *V. tapetis* strain which, to date has not been compared with other ones. It appeared less pathogenic than CECT4600 strain which has been considered and can still be considered as the most pathogenic *V. tapetis* strain (Choquet et al., 2003). Results obtained for SRS values could give us information about clam immune abilities given the fact that only diseased animals were considered. Trends observed for SRS were quite opposite for 15 and 20°C. In fact at 15°C repair abilities were better for EMSF injected animals than for FPC1121 injected clams which also had better abilities than CECT4600 injected animals. At 20°C repair stages were globally higher for CECT4600 injected animals than for others meaning that the pathogenicity difference observed through CDS resulted mainly from differences in immune abilities. These animals lived, in their origin environment, in "hot" water (i.e. 22°C on the sampling day, in Matsusaka) and even if this temperature is close to *V. tapetis* optimal growth temperature, pathogenicity of both strains was lower thanks to better immune capacities of manila clams.

Animals from Akkeshi appeared less sensitive to both *V. tapetis* strains as the CDS values were globally lower than for animals from Matsusaka independently of temperature. This result is contradictory with results obtained by Yan et al (2005) who found that Zebra clams had the highest survival rate and tolerance to environmental stressors than other pedigrees. This study (Yan et al., 2005) did not underline that Zebra clams were more resistant than other pedigrees but rather demonstrated that different clam populations may have contrasted immune abilities which is consistent with our conclusions. Indeed, repair abilities are also

globally better for population from Akkeshi than for population from Matsusaka as shown by greater SRS values in animals from the North of Japan.

For animals from Akkeshi, acclimated at 15°C, there was no significant difference in CDS distribution between any of the three conditions. The proportions of asymptomatic animals are relatively high, independently of the injection which indicates very low sensitivity of these clams to *V. tapetis*. Indeed, since the proportion of healthy clams in SSW injected animals was not significantly different of any other injections, the observed proportions of diseased animals in CECT4600 and FPC1121 injected animals may be related to natural prevalence of BRD in this population and/or be a consequence of the injection (whatever the strains or SSW) itself. *V. philippinarum* is a species with a wide range of thermal tolerance even if its optimal temperature for growth is comprised between 20 and 24°C (Solidoro et al., 2000). In Akkeshi, when clams were collected, water temperature was around 8°C. Despite this cold temperature, clams seemed to have better growth than clams from Matsusaka given the fact that their mean length was higher than for animals from Matsusaka. Moreover their immune system did not appeared weakened as there were less diseased animals in this population than in the other one.

At 20°C animals were not more sensitive to *V. tapetis* as the proportions of healthy animals in both strain injected animals were not different to proportions at 15°C. The most surprising result was obtained for animals injected with SSW because the proportion of diseased animals was higher than for *V. tapetis* injected animals. So, for this population, the injection of SSW led to more advanced disease stages than injection of *V. tapetis*. Moreover, as there was no significant difference in CDS distribution between CECT4600 and FPC1121 injected animals, no difference of pathogenicity could be concluded for this population at this temperature and more precisely no pathogenicity could be concluded for the used strains for this population, at 20°C. Results obtained for SRS could not allow us to have any conclusion about immune abilities of clams. In fact, firstly CDS results did not indicate that at this temperature there was any pathogenicity from any strain and secondly SRS are determined on diseased clams and for these experimental conditions the number of diseased clams was very low.

Results obtained in this study suggest new perspectives. For instance, it would be interesting to test and compare the pathogenicity of the new *V. tapetis* strain (i.e. FPC1121) on manila clams from Europe. Furthermore, it seems also relevant to study the relative resistance of Akkeshi clams to the different bacteria strains and it would be particularly interesting in farms. Clams imported in France in the early 70 seemed susceptible to BRD as mortality

events, following their introduction, showed. Question may be asked about BRD evolution in Europe if more resistant clams, as Akkeshi's ones, had been imported in Europe.

Conclusions

This study firstly highlighted the difference in susceptibility and resistance to *V. tapetis* between 2 populations of clams characterized by different pedigrees. Individuals from Matsusaka appeared more sensitive to *V. tapetis* and for this population, CECT4600 strain was more virulent than the new isolated strain FPC1121. The increase of temperature from 15 to 20°C led to lower disease stages especially thanks to better immune abilities. The higher mean PO level activity in animals from Matsusaka is probably linked to higher natural BRD prevalence in these clams compared with animals from Akkeshi. Even if their mean PO level activity was globally lower than for the other population, clams from Akkeshi did not appear sensitive to *V. tapetis* and this was independently of the strain. Further investigation is required to better understand how and why this population did not seem sensitive to *V. tapetis*. This appears critical since these clams could represent a solution to solve the BRD issue.

Acknowledgments

This work was supported by the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19) and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir". This work was also partly funded by University of Western Brittany. We thank Corinne Floc'h-Laizet for her administrative help. We would like to thank Tomakazu and Takashi to welcome us in the laboratory and for their technical assistance.

References

- Allam, B., et al., 2000. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. Diseases of aquatic organisms. 41, 105-113.
- Bartoli, P., Recherches sur les Gymnophallidae FN Morozov, 1955 (Digenea), parasites d'Oiseaux des côtes de Camargue: systématique, biologie et écologie. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille, 1974.
- Bezemer, B., et al., 2006. Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. Fish & shellfish immunology. 20, 627-636.
- Borrego, J. J., et al., 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. International journal of systematic bacteriology. 46, 480-484.

- Bourne, N., 1982. Distribution, reproduction, and growth of Manila clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeves), in British Columbia [Canada]. Journal of Shellfish Research. 2.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72, 248-254.
- Butt, D., Raftos, D., 2008. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. Developmental & Comparative Immunology. 32, 299-306.
- Castro, D., et al., 1992. Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. Diseases of aquatic organisms. 14, 229-236.
- Cerenius, L., et al., 2010. In vitro effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. Journal of invertebrate pathology. 103, 21-23.
- Cesari, P., Pellizzato, M., 1990. *Tapes philippinarum*: biologia e sperimentazione. Ente di Sviluppo Agricolo Veneto, Ch. Biologia di *Tapes philippinarum*. 21-46.
- Choquet, G., et al., 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. Diseases of aquatic organisms. 57, 109-116.
- Cochennec-Laureau, N., et al., 2011. Les surmortalités des naissains d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*: acquis des recherches en 2010.
- Feng, S., et al., Humoral responses in the American oyster (*Crassostrea virginica*) infected with *Bucephalus* sp. and *Minchinia nelsoni*. A symposium on diseases of fishes and shellfishes., 1970, pp. 497-510.
- Flassch, J.-P., Leborgne, Y., Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement. Introductions and Transfers of Aquatic species. Selected papers from a Symposium Held in Halifax, Nova Scotia, 12-13 June 1990, 1992.
- Fox, J., Weisberg, S., An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks, CA, 2011.
- Goulletquer, P., Etude des facteurs environnementaux intervenant sur la production de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. Université de Bretagne Occidentale, 1989.
- Haberkorn, H., Description des paramètres de croissance, de cytotoxicité et des caractéristiques sérologiques et génétiques d'une souche de *Vibrio* sp. thermotolérante. Rapport de master. Université de Bretagne Occidentale Quimper, 2005.
- Humphreys, J., et al., 2007. Population dynamics of naturalised Manila clams *Ruditapes philippinarum* in British coastal waters. Marine Biology. 151, 2255-2270.
- Jeffroy, F., Production et caractérisation de familles de palourdes japonaises, *Ruditapes philippinarum*, résistantes à la maladie de l'anneau brun. Université de Bretagne occidentale-Brest, 2011.
- Jensen, S., et al., 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corks wing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. Diseases of aquatic organisms. 53, 25-31.
- Johnston, M., Brown, M., 2002. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. Journal of applied microbiology. 92, 1066-1077.
- Laruelle, F., Phénologie et déterminisme de la reproduction chez *Ruditapes decussatus* (L.) et *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve) en Bretagne. 1999.
- Le Bris, C., et al., 2013. Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties. Fish & shellfish immunology.

- Liu, X., et al., 2013. Metabolomic analysis revealed the differential responses in two pedigrees of clam *Ruditapes philippinarum* towards *Vibrio harveyi* challenge. Fish & shellfish immunology.
- Maes, P., 1992a. Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins d'intérêt commercial, *Ruditapes philippinarum* et *Paracentrotus lividus*. These de Doctorat Université de Brest, France.
- Maes, P., Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins d'intérêt commercial, *Ruditapes philippinarum* et *Paracentrotus lividus*. France, Vol. These de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 1992b, pp. 216.
- Makino, K., et al., 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. The Lancet. 361, 743-749.
- Matsuyama, T., et al., 2010. First isolation of *Vibrio tapetis*, the Etiological Agent of Brown Ring Disease (BRD), in Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. Fish Pathology. 45 (2), 77-79.
- Newton, K., et al., 2004. Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Developmental & Comparative Immunology. 28, 565-569.
- Paillard, C., Etiologie et caracterisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'elevage *Ruditapes philippinarum*. Vol. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 1992, pp. 296.
- Paillard, C., 2004a. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilitation à diriger des recherches (HDR), Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Paillard, C., 2004b. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Aquatic Living Resources. 17, 467-475.
- Paillard, C., et al., 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Diseases of aquatic organisms. 59, 249-262.
- Paillard, C., Maes, P., 1990. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie. 310, 15-20.
- Paillard, C., Maes, P., 1994. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. Diseases of aquatic organisms. 19, 137-146.
- Paillard, C., Maes, P., 1995. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. Journal of invertebrate pathology. 65, 91-100.
- Paillard, C., et al., Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of Atlantic coast: role of temperature in variations of prevalence. Proceedings of VIIIe Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Vol. 31, 1997, pp. 32.
- Paillard, C., et al., 1994. Brown ring disease in clams. Annual Review of Fish Diseases. 4, 219-240.
- Paillard, C., et al., 1989. Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie. 309, 235-241.
- Park, K.-I., et al., 2006. Report on the occurrence of brown ring disease (BRD) in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, on the west coast of Korea. Aquaculture. 255, 610-613.

- Park, K.-I., et al., 2008. Pathology survey of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* occurring on sandy tidal flats along the coast of Ariake Bay, Kyushu, Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*. 99, 212-219.
- Reid, H. I., et al., 2003. Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*. 221, 65-74.
- Robert, R., Deltreil, J., 1990. Elevage de la plaourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* dans le bassin d'Aracachon. Bilan des dix dernières années et perspectives de développement. Rapport internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. IFREMER.
- Samain, J.-F., McCombie, H., 2008. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*: the Morest Project. Éditions Quae.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current opinion in immunology*. 10, 23-28.
- Solidoro, C., et al., 2000. Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in Northern Adriatic lagoons. *Marine ecology. Progress series*. 199, 137-148.
- Soudant, P., et al., 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*,= *Ruditapes*) *philippinarum*. *Aquaculture*. 229, 401-418.
- Team, R. C., R: A language and environment for statistical computing. In: R. F. f. S. Computing, (Ed.), Vienna, Austria, 2013.
- Trinkler, N., et al., 2010. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104, 8-16.
- Venables, W. N., Ripley, B. D., Modern applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York, 2002.
- Xing, J., et al., 2012. Phenoloxidase in the scallop *Chlamys farreri*: Purification and antibacterial activity of its reaction products generated *in vitro*. *Fish & shellfish immunology*. 32, 89-93.
- Yan, X., et al., 2005. A comparison of growth and development of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) from two pedigrees. *J. Dalian Fish. Univ.* 20, 266-269.
- Yap, W. G., 1977. Population biology of the Japanese little-neck clam, *Tapes philippinarum*, in Kaneohe Bay, Oahu, Hawaiian Islands. *Pacific Science*. 31, 223-244.

Discussion et perspectives

Les travaux menés au LEMAR sur la palourde japonaise, *Venerupis philippinarum*, ont débuté il y a environ 25 ans. Les connaissances acquises sur cette espèce sont très documentées et l'interaction entre la palourde japonaise et la bactérie pathogène *Vibrio tapetis* a fait l'objet de nombreuses études depuis 1987 et les premières mortalités causées par la maladie de l'anneau brun. Cependant, la biochimie du système immunitaire du vénéridé n'avait, jusqu'alors, été que peu explorée. L'étude du rôle du système des phénoloxydases chez la palourde japonaise a débuté il y a 4 ans au LEMAR. Mon travail de thèse, commencé il y a 3 ans, s'est alors inscrit dans ce nouvel axe de recherche portant sur une approche biochimique de l'interaction entre un hôte, un agent pathogène et leur environnement. Mon travail a consisté à définir et à caractériser le système enzymatique des phénoloxydases puis à comprendre le rôle et le fonctionnement de ce système au sein de l'interaction entre la palourde japonaise et l'agent pathogène, *V. tapetis*, responsable de la maladie de l'anneau brun. Cette partie reprend et discute les principaux résultats obtenus durant mon travail de thèse et ouvre sur de nouvelles perspectives de recherche.

Une activité phénoloxydase caractérisée dans le sérum d'hémolymphe de Venerupis philippinarum

L'activité phénoloxydase (PO) dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe de palourde japonaise, *V. philippinarum*, est majoritairement une activité de type laccase. Cependant, une activité de type tyrosinase minoritaire mais non négligeable a été également mise en évidence. Le pH optimal et la température optimale de cette activité enzymatique sont respectivement de 8,4 et 40°C. La dénaturation de l'enzyme se produit à partir d'une température de 50°C, son poids moléculaire a été estimé à 71,2KDa et son point isoélectrique à 4,2.

Les résultats obtenus à l'issue de la caractérisation biochimique de l'activité PO dans le sérum d'hémolymphe chez *V. philippinarum* ne sont que partiellement en accord avec les résultats obtenus par Cong et collaborateurs (2005). En effet, ces auteurs concluent que l'activité PO dans le sérum d'hémolymphe de *V. philippinarum* est uniquement de type tyrosinase. Nos résultats, quant à eux, montrent que l'activité de type tyrosinase n'est que minoritaire au sein du sérum d'hémolymphe et que l'activité de type laccase est majoritaire. Dans leur étude, Cong et collaborateurs n'ont utilisé que 2 substrats, la L-DOPA et la

Tyrosine, mais aucun substrat spécifique des laccases n'a été testé. De plus, aucun inhibiteur spécifique n'a été utilisé au cours de cette étude et leur conclusion sur la présence d'une activité enzymatique de type tyrosinase chez *V. philippinarum* ne repose que sur l'oxydation de la Tyrosine.

Dans notre étude, le travail de caractérisation biochimique a porté sur l'hémolymph des palourdes. Le choix de travailler sur l'hémolymph, plutôt que sur un autre compartiment, a été basé sur le caractère « général » de l'hémolymph puisqu'il s'agit d'un fluide circulant, en contact avec les différents organes de l'animal via le système circulatoire semi-ouvert. Au sein de cette hémolymph, le choix a été fait de travailler sur la fraction acellulaire : le sérum. Ce choix de travailler particulièrement sur ce compartiment était basé sur des études précédentes ayant mis en avant une activité PO plus importante dans cette fraction par rapport à la fraction cellulaire (Reid *et al.*, 2003 ; Paillard, 2004a). Par ailleurs, d'après la littérature, notamment les nombreuses études portant sur le système PO chez les arthropodes, les POs sont des enzymes qui semblent, de façon générale, être stockées sous une forme inactive (proPO) dans les hémocytes et ne sont activées, par clivage protéolytique, qu'une fois exocytées dans le sérum (Johansson & Söderhall, 1985 ; Galko & Krasnow, 2004 ; Cerenius *et al.*, 2008). En étudiant le système PO dans le sérum, notamment dans les études physiologiques, ce n'est pas la réponse potentielle qui est étudiée mais la réponse effective. En effet, les hémocytes contiennent une « réserve » de proPO mais lorsqu'on veut étudier la réponse immunitaire, ce n'est pas la capacité de réponse (ici la réserve de proPO dans les hémocytes) qu'il est important de quantifier mais la réponse réelle, à savoir la proPO effectivement libérée et activée dans le sérum. Les connaissances sur le système PO ne sont pas suffisantes chez *V. philippinarum* pour affirmer que la quantité de proPO libérée dans le sérum est proportionnelle à la quantité de proPO présente et stockée dans les hémocytes. L'étude, au niveau transcriptionnelle des POs pourrait, à terme, permettre d'étudier cette relation potentielle entre la quantité de POs activées dans le sérum et la quantité de zymogène effectivement présente dans les hémocytes.

Des travaux ont été initiés en 2012 au laboratoire afin de rechercher, chez la palourde japonaise, les gènes potentiellement associés à la reconnaissance des organismes pathogènes ainsi que les effecteurs immunitaires induits par la reconnaissance de ceux-ci. Ce travail, basé sur l'utilisation de banques d'EST a permis de mettre en avant deux séquences laccases (LacA et LacB) dont l'expression diffère au sein de l'animal. En effet, alors que la laccase LacA est principalement exprimée au niveau des hémocytes, la laccase LacB semble davantage ubiquitaire et est exprimée dans tous les tissus testés, à savoir les branchies, la glande

digestive, le manteau et la fraction cellulaire de l'hémolymph (M. Perrigault, communication personnelle). Le fait que l'une de ces deux laccases soit principalement exprimée dans les hémocytes ne signifie pas que la protéine s'y trouve sous sa forme active étant donné que la phénoloxydase est synthétisée sous sa forme inactive et est activée par clivage protéolytique. Ce clivage peut être réalisé, *in vitro*, grâce à l'utilisation d'activateurs.

Au cours de nos différentes expérimentations, aussi bien sur la palourde japonaise que sur l'ormeau européen, l'utilisation d'activateurs n'a pas été nécessaire. En effet, à travers la littérature, différents activateurs des zymogènes de la PO ont été utilisés, *in vitro*, parmi lesquels le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), le laminarin, le Triton X-100, la trypsine ou encore la chymotrypsine (Hernández-López *et al.*, 1996 ; Asokan *et al.*, 1997 ; Deaton *et al.*, 1999 ; Luna-González *et al.*, 2003 ; Hellio *et al.*, 2007 ; Aladaileh *et al.*, 2007 ; Jayaraj *et al.*, 2007 ; García Carreño *et al.*, 2008 ; Fan *et al.*, 2009 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2009). Dans notre étude, l'utilisation d'activateurs potentiels s'est avérée vaine. En effet, des tests préliminaires nous ont prouvé que l'activité PO dans le sérum de palourde japonaise était déjà sous sa forme active puisque l'activité PO n'était pas significativement différente en présence de SDS à différentes concentrations et sans SDS. Cette auto-activation de la PO pourrait notamment résulter du stockage à -80°C de l'hémolymph puisqu'avant son utilisation pour les différentes expérimentations, le sérum était stocké à une température de -80°C. L'activation *in vivo* de la proPO en PO active peut résulter de l'intrusion, dans l'organisme, d'un corps étranger ou de molécules d'organismes étrangers mais peut également résulter d'un choc abiotique (Luna-González *et al.*, 2003 ; Galko & Krasnow, 2004 ; Cerenius *et al.*, 2008). Ainsi, la congélation à -80°C semble être un stimulus conduisant à l'activation de la proPO du sérum chez les deux espèces étudiées. Une telle activation de la proPO a également été observée dans le plasma de la crevette à pattes blanches, *Litopenaeus vannamei*, lorsqu'il est placé sur glace ou stocké à -20°C (Huang *et al.*, 2010). Dans notre étude, étant donnée la non-activation constatée en l'absence de congélation à -80°C, il est possible de conclure que la proPO n'est pas « naturellement » activée dans le sérum comme cela a déjà été observé chez *Peneaus monodon*. En effet, chez cette espèce de crevette, deux proPO sont présentes dans le sérum : la première est activée en cas d'infection par un agent pathogène ou, plus généralement, en présence d'un activateur exogène alors que la seconde est naturellement activée dans le sérum mais son activité est réduite en cas d'infection (Radha *et al.*, 2013). Cette étude souligne des réponses différentielles de la part de ces deux proPO présentes dans le sérum et met en avant le rôle antiviral de la seconde forme de la proPO au sein de l'immunité humorale de l'organisme.

Par ailleurs, l'existence de deux proPOs chez cette espèce de crevette souligne l'importance de poursuivre les travaux de purification entrepris et de rechercher d'éventuelles isoformes de laccases. Ainsi, chez la palourde, l'hypothèse de plusieurs isoformes de POs ayant des rôles différents dans un compartiment donné pourrait être une piste pertinente à explorer. En effet, chez l'huître australienne, *Saccostrea glomerata* il a été montré qu'une isoforme de PO en particulier était contre sélectionnée chez les animaux résistants à la maladie QX causée par l'agent pathogène *Marteilia sydneyi* (Bezemer *et al.*, 2006). Aussi, dans le cas de l'interaction entre *V. philippinarum* et son micro-organisme pathogène, *V. tapetis*, il pourrait être envisagé de suivre la cinétique d'action de différentes isoformes de POs dans différents compartiments de l'animal. L'intérêt serait d'utiliser des lots de palourdes aux sensibilités différentes face à la MAB (Trinkler *et al.*, 2010 ; Jeffroy, 2011), afin d'étudier et de comparer les isoformes potentiellement présentes dans différents compartiments de l'animal, chez des animaux considérés comme sensibles et chez d'autres considérés comme résistants à la MAB. Cela dit, avant de pouvoir interpréter la réponse d'isoformes de POs à une infection bactérienne, il semble primordial de connaître la réponse globale de ce système enzymatique chez des organismes confrontés à la maladie.

Dans notre étude, la caractérisation biochimique de l'activité PO n'a été entreprise que dans le sérum d'hémolymphe. Cependant il serait intéressant de poursuivre ces recherches en explorant les différents tissus de l'animal mais aussi les fluides extrapalléaux. Cela permettrait notamment de savoir, si différentes activités POs sont présentes chez cette espèce. Chez les insectes par exemple, il a été démontré que des tyrosinases et des laccases peuvent être présentes dans un même tissu mais avoir des fonctions différentes. Les laccases serviraient davantage dans la formation de la cuticule et dans l'induration de celle-ci alors que les tyrosinases rempliraient davantage une fonction immunitaire (Barrett & Andersen, 1981). Cette recherche d'activité PO dans différents tissus a été entreprise chez un autre mollusque bivalve, l'huître *C. gigas* et les résultats montrent qu'une activité laccase est présente dans les différents tissus étudiés (i.e. branchies, glande digestive, manteau et muscle) mais qu'une activité catéchol oxydase n'est présente que dans le muscle (Luna-Acosta, 2010). Cette étude de l'activité PO dans différents compartiments de palourdes japonaise serait particulièrement intéressante chez des animaux touchés par la MAB. En effet, le développement de la maladie commence par la colonisation de la lame périostacale par la bactérie, se poursuit par la pénétration dans les tissus et peut aller jusqu'à la colonisation des différents fluides de l'animal. Cette cinétique de la maladie pourrait être étudiée à travers la réponse immunitaire et plus précisément l'activité PO, ce qui permettrait notamment de voir si la progression de la

bactérie à travers les différents compartiments de l'animal est corrélée à des variations significatives des activités PO d'un compartiment à un autre. Autrement dit, cela permettrait de savoir si le succès de la bactérie dans la colonisation au sein de son hôte est lié à une défaillance ou un affaiblissement du système enzymatique étudié. En dehors de l'avancement de la maladie, ces cinétiques enzymatiques pourraient également être suivies en fonction des stades de réparation de la palourde étant donné l'implication directe du système PO dans la synthèse de conchioline, dérivé de la mélanine, qui vient recouvrir les bactéries sur la lame périostracale.

Réponse enzymatique de Venerupis philippinarum exposée à Vibrio tapetis

Nous n'avons pas mis en évidence l'existence d'un cycle endogène de sécrétion PO, SOD ou catalase chez la palourde japonaise. L'infection de V. philippinarum par V. tapetis entraîne, de façon générale, une augmentation de l'activité PO. Cependant, cette augmentation varie selon le compartiment étudié et sa proximité par rapport au site d'infection et selon le temps de réponse après l'infection. Néanmoins, l'inhibition de l'activité PO observée, in vitro, en présence d'ECPs bactériens souligne la complexité de l'interaction entre V. philippinarum et V. tapetis.

La recherche de cycles endogènes de sécrétion des enzymes PO, SOD et catalase s'est avérée vaine ce qui signifie, dans le cas de notre étude, que d'éventuelles variations d'activités enzymatiques peuvent être interprétées comme une réponse aux infections bactériennes et non comme le simple reflet de variations « naturelles ». De tels cycles endogènes ont déjà été décrits dans la littérature (Kim *et al.*, 1999 ; Soudant *et al.*, 2004 ; Tran *et al.*, 2011 ; Mat *et al.*, 2012) et concernent certains paramètres du système immunitaire tels que le nombre total d'hémocytes ou l'indice de condition, mais à ce jour, jamais au niveau des activités enzymatiques.

Dans le cadre de l'infection de *V. philippinarum* par *V. tapetis* CECT4600 ou *V. tapetis* LP2, les injections bactériennes ont été réalisées dans la cavité extrapalléale périphérique des palourdes. Ce type d'injection n'avait jamais été réalisé dans le but d'étudier la réponse immunitaire du manteau et du sérum hémolympatique. Cependant, l'injection de bactéries dans la cavité extrapalléale centrale avait déjà été réalisée par Allam *et al.* (2002)

mais l'injection était alors faite en perçant la coquille pour atteindre le compartiment extrapalléal central. Dans le cas de notre étude, nous avons choisi d'injecter les bactéries en passant sous le bord du manteau en ne franchissant pas la ligne palléale, afin de mimer au mieux ce qu'il se passe en conditions naturelles lorsque la bactérie pathogène progresse de la lame périostracale vers la cavité extrapalléale périphérique. En effet, en injectant ainsi les bactéries directement dans la cavité extrapalléale, les bactéries n'ont pas à passer la barrière naturelle formée par la lame périostracale. La cinétique de la maladie est en quelque sorte artificiellement accélérée par rapport à ce qui se passe dans le milieu naturel où l'agent pathogène pénètre dans l'animal via sa cavité palléale avant de venir se fixer à la surface interne de la coquille de l'animal au niveau du périostracum (Paillard, 1992 ; Paillard & Le Pennec, 1993 ; Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard & Maes, 1995).

Que ce soit dans le manteau ou dans l'hémolymphe des animaux étudiés, l'injection dans la cavité extrapalléale périphérique de bactéries entraîne une augmentation des activités PO. Cependant, les différentes variations d'activités enzymatiques observées dans chaque compartiment ne sont pas synchrones. Cette différence temporelle dans la réponse enzymatique à l'infection bactérienne peut s'expliquer tout d'abord par l'anatomie de l'espèce. En effet, le manteau est le tissu qui ferme la cavité extrapalléale, et est, de fait le premier en contact avec la zone infectée et plus précisément avec les bactéries injectées. Nos résultats confirment cette hypothèse, car le manteau est le premier compartiment pour lequel on observe une augmentation de l'activité PO de façon à produire davantage de composés bactéricides. Dans le compartiment hémolympatique, la réponse semble plus tardive puisque l'augmentation d'activité PO n'est visible qu'à partir de 3 jours après les injections. Cela traduit notamment le fait que l'hémolymphe est un fluide circulant au sein duquel la réponse enzymatique va être diluée. De plus, la réponse observée dans l'hémolymphe ne traduit pas nécessairement une infection de celle-ci puisque la bactérie pathogène n'est pas présente dans l'hémolymphe, mais peut refléter la mobilisation et le transport de la défense immunitaire vers les zones infectées. Par ailleurs, ces cinétiques temporelles de la réponse de la PO sont à relier à la cinétique de développement de la MAB au cours de laquelle les bactéries se fixent dans un premier temps sur la surface externe du périostracum avant de coloniser la périphérie de la couche interne de la coquille, le bord du manteau puis la lame périostracale qu'elles altèrent (Paillard, 1992 ; Paillard et Le Pennec, 1993 ; Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard et Maes 1995a, b). Ce sont ensuite les compartiments extrapalléaux périphériques puis le compartiment central qui sont colonisés avant la colonisation des tissus puis des fluides hémolympatiques (Paillard, 2004a).

L'augmentation d'activité constatée après les infections bactériennes traduit la réponse de la palourde face à l'entrée d'un corps étranger identifié comme faisant partie du non soi. Des activités PO moyennes plus élevées chez la population issue du sud du Japon par rapport à celle issue du nord du pays ont également été observées mais la prévalence de la MAB chez la population du sud était également plus élevée. Si malgré une augmentation des activités enzymatiques, la bactérie parvient à dominer le système immunitaire de la palourde et à s'établir au sein de celle-ci, cela signifie que la réponse immunitaire n'a pas été efficace ou qu'elle n'a pas été suffisante. Une augmentation « artificielle » de l'activité PO a été réalisée chez la crevette *Penaeus monodon* confrontée à la bactérie *Vibrio harveyi* par enrichissement de la nourriture avec des bactéries probiotiques (Rengpipat *et al.*, 2000). Chez la palourde japonaise, cette solution paraît difficilement envisageable étant donné le mode d'alimentation filtreur suspensivore de l'espèce et l'absence de bactéries probiotiques connues chez cette espèce (Prado *et al.*, 2010). Cependant si l'activité PO ne peut être « artificiellement » augmentée, il est possible d'envisager un programme de sélection visant à rechercher des individus ayant un niveau d'activité PO naturellement plus élevé, leur conférant une plus grande résistance aux agents pathogènes comme cela a été réalisé chez l'huître australienne, *Saccostrea glomerata* (Newton *et al.*, 2004). Néanmoins, pour qu'un tel programme soit mis en place et soit pérenne, il faudrait que cette activité PO plus élevée soit un caractère héréditaire et donc reproductible par croisements d'individus.

La complexité de l'interaction entre *V. tapetis* et la palourde japonaise est visible à travers l'activité PO puisque l'infection *in vivo* par la bactérie entraîne une augmentation de l'activité PO alors que les produits extracellulaires bactériens ont un effet inhibiteur, *in vitro*, sur l'activité PO. Cela reflète concrètement le « combat » mené entre les deux protagonistes de l'interaction. En effet, alors que l'augmentation d'activité PO chez la palourde a pour but d'éliminer le corps étranger ayant pénétré en son sein, l'inhibition d'activité PO provoquée par les produits issus de la bactérie a pour but de permettre à cette dernière de s'établir dans son hôte. Les concentrations en ECPs testées au cours de nos travaux sont relativement élevées par rapport aux concentrations supposées *in vivo* (Labreuche *et al.*, 2006), cependant, il serait intéressant d'étudier, plus en détails, l'activité PO et l'inhibition de celle-ci en fonction de la progression de la bactérie. En effet, lorsque les bactéries se sont fixées et sont présentes en quantités importantes le long du périostacum, la concentration en ECPs doit augmenter et provoquer une inhibition de l'activité PO. Il est envisageable d'évaluer l'importance des dépôts bruns de conchioline en fonction du temps et de la concentration en bactéries pour évaluer l'impact de ces ECPs sur le mécanisme de défense de recouvrement

des bactéries par les dépôts constitués de dérivés de la mélanine. Pour affiner les résultats obtenus au cours de ma thèse, il serait également possible de purifier les ECPs pour identifier le(s) composé(s) responsable(s) de l'action inhibitrice sur l'activité PO.

Dans notre étude, seule l'activité PO de la palourde a été mesurée mais les activités PO potentielles d'origine bactérienne n'ont pas été explorées. Au cours de notre étude mesurant l'effet des ECPs bactériens sur l'activité PO du sérum d'hémolymphe de *V. philippinarum*, les blancs réalisés pour quantifier l'autooxydation du substrat contenait uniquement de l'eau, des ECPs dilués dans du tampon et du substrat. Ces milieux réactionnels ne montraient pas d'oxydation significative du substrat, ce qui signifie que les ECPs seuls n'ont pas d'activité PO. Cela dit, dans le génome de *V. harveyi* et *V. tapetis*, des domaines laccases ont déjà été répertoriés (Projets Vibrioscope, Genoscope). Cela ne signifie pas que ces bactéries possèdent des laccases fonctionnelles mais la présence d'activité PO chez ces bactéries n'est pas une hypothèse à négliger. Si de telles activités étaient mises en avant chez *V. tapetis* il faudrait reconsidérer l'origine des dépôts bruns observés chez des palourdes infectées. Jusqu'alors ces dépôts bruns étaient considérés comme des mécanismes de défenses face à la bactérie mais si cette dernière était à l'origine des dépôts mélanisés, cela pourrait avoir pour but de détériorer le périostacum de l'hôte et ainsi accélérer la progression à l'intérieur de ce dernier.

Effets du facteur température sur l'interaction hôte-pathogène entre Venerupis philippinarum et Vibrio tapetis

L'augmentation de la température de 15 à 22°C, entraine une augmentation du niveau basal d'activité PO et donc des capacités immunitaires. La réponse enzymatique, chez des animaux infectés par V. tapetis, est augmentée avec la température et se traduit par une meilleure résistance et une meilleure réparation coquillière face au développement de la maladie de l'anneau brun. Néanmoins, la virulence des différentes souches de V. tapetis est également modulée par la température et ce, de façon différentielle selon les souches.

Tout comme les niveaux d'activités enzymatiques, les contenus en protéines totales des compartiments étudiés sont également significativement plus importants à 22°C. Cela traduit le fait qu'à 22°C, davantage de protéines sont synthétisées par les animaux et parmi ces protéines, des protéines du système immunitaire. Cette augmentation des contenus

protéiques va donc de pair avec les meilleures capacités immunitaires observées à 22°C par rapport à celles observées à 15°C.

Alors que les variations des activités enzymatiques observées à 15°C suggèrent une virulence plus importante de *V. tapetis* CECT4600 par rapport à *V. tapetis* LP2, les résultats obtenus à 22°C ne révèlent pas de différence de virulence entre les deux souches. Ce constat de l'absence de différence de virulence entre les deux souches est tout d'abord le reflet d'une meilleure capacité immunitaire de la part des palourdes à 22°C. Ce résultat est cohérent avec la biologie de l'espèce puisque la température optimale de croissance de *V. philippinarum* a été définie comme comprise entre 20 et 24°C (Solidoro *et al.*, 2000). Cela signifie, qu'entre ces températures, l'organisme n'a pas besoin de mobiliser beaucoup d'énergie pour assurer son métabolisme basal et peut donc utiliser cette énergie pour augmenter ses défenses immunitaires (Flye Sainte-Marie *et al.*, 2007). Cette part plus importante d'énergie allouée à la défense immunitaire, à 22°C par rapport à 15°C, est visible à travers la réparation coquillière développée par les palourdes face à *V. tapetis*. En effet, les stades de réparation coquillière sont plus élevés à 22°C pour les deux souches étudiées.

Alors que la température de croissance optimale de *V. tapetis* CECT4600 est de 20°C (Maes, 1992 ; Haberkorn, 2005), celle de la souche LP2 est de 23°C (Jensen *et al.*, 2003). Ainsi, à 22°C, la souche LP2 est plus proche de son optimal de croissance que la souche CECT4600 ce qui contribue au fait qu'à 22°C, la différence de virulence n'est plus observée puisque face à des défenses immunitaires augmentées, la souche la moins virulente pourrait être plus efficace que la souche considérée comme plus virulente pour *V. philippinarum*. Ces résultats sont à replacer dans un contexte de réchauffement climatique. En effet, une augmentation de la température globale des océans pourrait se traduire pour la palourde par de meilleures capacités immunitaires mais il ne faut pas non plus négliger le fait que certaines souches de *V. tapetis*, jusqu'à là considérées comme peu ou pas virulentes pourraient voir leur pathogénicité augmentée par le réchauffement de leur environnement. Bien souvent, seules la croissance et la survie des bactéries sont considérées lorsque l'impact de la température est étudié chez des espèces bactériennes. Cependant, il a été démontré que chez des bactéries du genre *Vibrio*, les facteurs de virulence peuvent être également directement impactés par la température (Colquhoun & Sorum, 2001). Dans ce sens, *V. tapetis* semble posséder au moins un facteur de virulence, thermosensible, lequel serait présent à la fois dans les cellules bactériennes intactes mais aussi dans les sécrétions bactériennes (Allam & Ford, 2006). Les résultats obtenus au cours de ma thèse soulignent, une fois de plus, l'importance de considérer la maladie de l'anneau brun comme une interaction tripartite et non pas seulement comme une

interaction entre la palourde et une bactérie. A ce titre, la MAB peut être comparée à la vibriose qui touche l'autre modèle biologique étudié au cours de mon travail de thèse, l'ormeau européen : *Haliotis tuberculata*. En effet, chez cette espèce, la vibriose ne se développe, chez des animaux matures, que si la présence de *Vibrio harveyi* coïncide avec des températures de l'eau supérieures à 17°C (Travers *et al.*, 2009). Ces cas de vibrioses impactées par la température de l'environnement ne sont pas isolés et d'autres espèces telles que les coraux sont directement touchés (Ben-Haim *et al.*, 2003). Cet effet de la température sur les cas de vibrioses en milieu marin abonde dans le sens d'une augmentation des épisodes de maladies et de mortalités massives liée au changement global (Harvell *et al.*, 2002 ; Doney *et al.*, 2012).

Activité phénoloxydase et susceptibilité différentielle chez deux populations japonaises de Venerupis philippinarum

Le niveau d'activité PO basal est variable d'une population à une autre et cette variabilité semble traduire une susceptibilité différente face à la MAB. Les deux souches de *V. tapetis* testées montrent des virulences différentes chez chacune des deux populations japonaises de *V. philippinarum* testées. L'une de ces deux populations présente une susceptibilité très faible, voire nulle à chacune des deux souches étudiées.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons eu la chance de pouvoir nous rendre au Japon, au cœur de l'aire de répartition d'origine de notre modèle d'étude, *V. philippinarum*. Les palourdes japonaises vivant au Japon, et particulièrement la population issue du Nord du Japon (Akkeshi), est apparue très peu sensible aux deux souches de *V. tapetis* testées. La faible sensibilité à *V. tapetis* de cette population par rapport aux animaux vivant au sud du pays (Matsusaka) n'était pas prévisible compte tenu des niveaux respectifs d'activité PO basale de ces 2 populations. Cependant la prévalence relativement élevée de la MAB, chez les palourdes issues de Matsusaka peuvent expliquer des niveaux d'activité PO globalement plus élevés par rapport aux animaux originaires d'Akkeshi. En effet, nos travaux et ceux de la littérature ont montré que l'exposition prolongée de *V. philippinarum* à *V. tapetis* se traduit par le développement de la MAB et s'accompagnerait d'une mobilisation du système PO. Ces résultats soulignent l'importance de connaître l'état sanitaire de l'animal et les différents

stress, qu'ils soient de nature biotique ou abiotique, auxquels l'animal est confronté avant de pouvoir utiliser l'activité PO comme biomarqueur des capacités immunitaires de l'organisme.

Cette résistance relative face à la MAB de la part de cette population d'Akkeshi n'est pas apparue fonction de la température puisqu'à 15 ou 20°C les animaux présentaient des niveaux de maladie particulièrement faibles. Ce résultat est rassurant pour les élevages vénériques japonais, et particulièrement ceux situés au nord du pays, dont la crainte est de voir remonter la maladie dans leurs eaux (T. Matsuyama, communication personnelle). La propagation de cette maladie, considérée comme une maladie d'eau froide, pourrait, en effet, être freinée, voire arrêtée, grâce à la présence de populations moins susceptibles à *V. tapetis* telles que la population étudiée issue d'Akkeshi.

Dans premier temps, il est envisageable que cette résistance, de la part des palourdes originaires du nord du Japon, soit due à une exposition à *V. tapetis* plus importante que dans nos régions. En effet, le concept de mémoire immunitaire est, à ce jour, de plus en plus accepté (Rowley & Powell, 2007). Bien qu'une quelconque mémoire immunitaire n'ait pas été démontrée chez *V. philippinarum*, il semble que des palourdes précédemment exposées à *V. tapetis*, développent une meilleure réparation coquillière (Trinkler, 2009). Il est donc possible que les palourdes du Nord du Japon soient particulièrement exposées à *V. tapetis* et aient, de ce fait de meilleures capacités de résistance face à ce micro-organisme pathogène. Cependant, *V. tapetis* n'avait jamais été isolé dans les eaux japonaises avant 2008 (Matsuyama *et al.*, 2010).

Paillard et collaborateurs ont avancé 2 hypothèses pour expliquer l'émergence de la MAB le long des côtes européennes. La première de ces hypothèses suppose que *V. tapetis* aurait été introduit en Europe en même temps que son hôte. Les introductions de *V. philippinarum*, en France, ont été réalisées à partir de populations établies aux Etats-Unis où la MAB n'a encore jamais été détectée alors que cette espèce y est élevée depuis près de 90 ans (Quayle, 1951 ; Bourne, 1982). Il n'y a visiblement pas de raison expliquant pourquoi la maladie ne se serait pas développée aux Etats-Unis alors qu'elle s'est développé le long de nos côtes. La seconde hypothèse avancée par Paillard et collaborateurs pour expliquer le développement de la MAB en Europe suppose que l'agent pathogène était déjà présent le long des côtes européennes en tant que parasite de l'espèce autochtone, *V. decussata*, avec qui *V. tapetis* aurait co-évolué expliquant ainsi la relative résistance de la palourde européenne face à cette bactérie. L'introduction de la palourde japonaise le long de nos côtes aurait alors procuré, à *V. tapetis*, un nouvel hôte plus sensible. Cette plus grande sensibilité se serait alors traduite par les épisodes importants de mortalité observés à partir de 1987 en France. Si l'on

considère que la recherche de *V. tapetis* dans les eaux japonaises est relativement récente, il est possible que cet agent pathogène soit présent dans les eaux japonaises depuis toujours et qu'il ait co-évolué avec les populations de palourdes et particulièrement les populations issues du nord du Japon, ce qui expliquerait la faible sensibilité de ces animaux à *V. tapetis*.

Quoi qu'il en soit, la population étudiée issue d'Akkeshi, au nord du Japon mériterait davantage de recherche, notamment au niveau des paramètres immunitaires. En effet, sa faible sensibilité à chacune des deux souches bactérienne testées, indépendamment de la température, pourrait faire de cette population un bon candidat pour l'importation et l'élevage le long de nos côtes. Cependant, il est important de noter que les deux populations étudiées présentaient des différences phénotypiques importantes, notamment au niveau de l'ornementation de la surface externe des valves. Alors que les palourdes issues du nord du Japon étaient blanches, celles du sud du pays étaient zébrées. Des différences de résistance aux stress environnementaux ont déjà été mises en avant entre des populations présentant des ornements différents (Yan *et al.*, 2005). En France, la SATMAR a arrêté de produire des palourdes japonaises blanches car celle-ci étaient plus sensibles à la MAB que les autres populations (C. Paillard, communication personnelle). Ce qu'il faut retenir de ces différentes études, c'est avant tout que des populations différentes, notamment différenciables par des paramètres phénotypiques comme les ornements de la coquille, peuvent présenter des capacités immunitaires différentes. Cependant, comme le prouve la différence entre ce qui a pu être observé en France et au Japon, il serait imprudent d'avancer comme une généralité, que les animaux présentant une ornementation donnée sont davantage résistants que des animaux possédant d'autres paramètres phénotypiques.

La comparaison de paramètres immunitaires a déjà été réalisée entre des palourdes japonaises originaires de France et des palourdes issues de la côte ouest des Etats-Unis, où la MAB n'a, à ce jour, jamais été observée. Les résultats montrent que le nombre total d'hémocytes, le pourcentage de granulocytes et la phagocytose sont, dans les fluides des animaux, significativement plus importants chez les animaux issus des Etats-Unis par rapport aux animaux français (Allam *et al.*, 2001). Cette tendance générale, observée pour plusieurs paramètres immunitaires, pourrait permettre de dessiner un profil immunitaire et d'estimer les capacités immunitaires d'un individu ou d'une population. Ce type de profil a pu être établi chez l'ormeau européen, *Haliotis tuberculata*, autre espèce de mollusque soumise à une vibriose, à partir de différents paramètres immunitaires parmi lesquels l'activité PO (Travers *et al.*, 2008). Chez *V. philippinarum*, l'utilisation de l'activité PO comme biomarqueur des capacités immunitaires est envisageable à condition de connaître l'état sanitaire des animaux.

La contribution de mon travail de thèse à une meilleure connaissance du système immunitaire de la palourde japonaise exposée à *V. tapetis*, à travers l'étude du système des phénoloxydase, est synthétisée dans la figure 42.

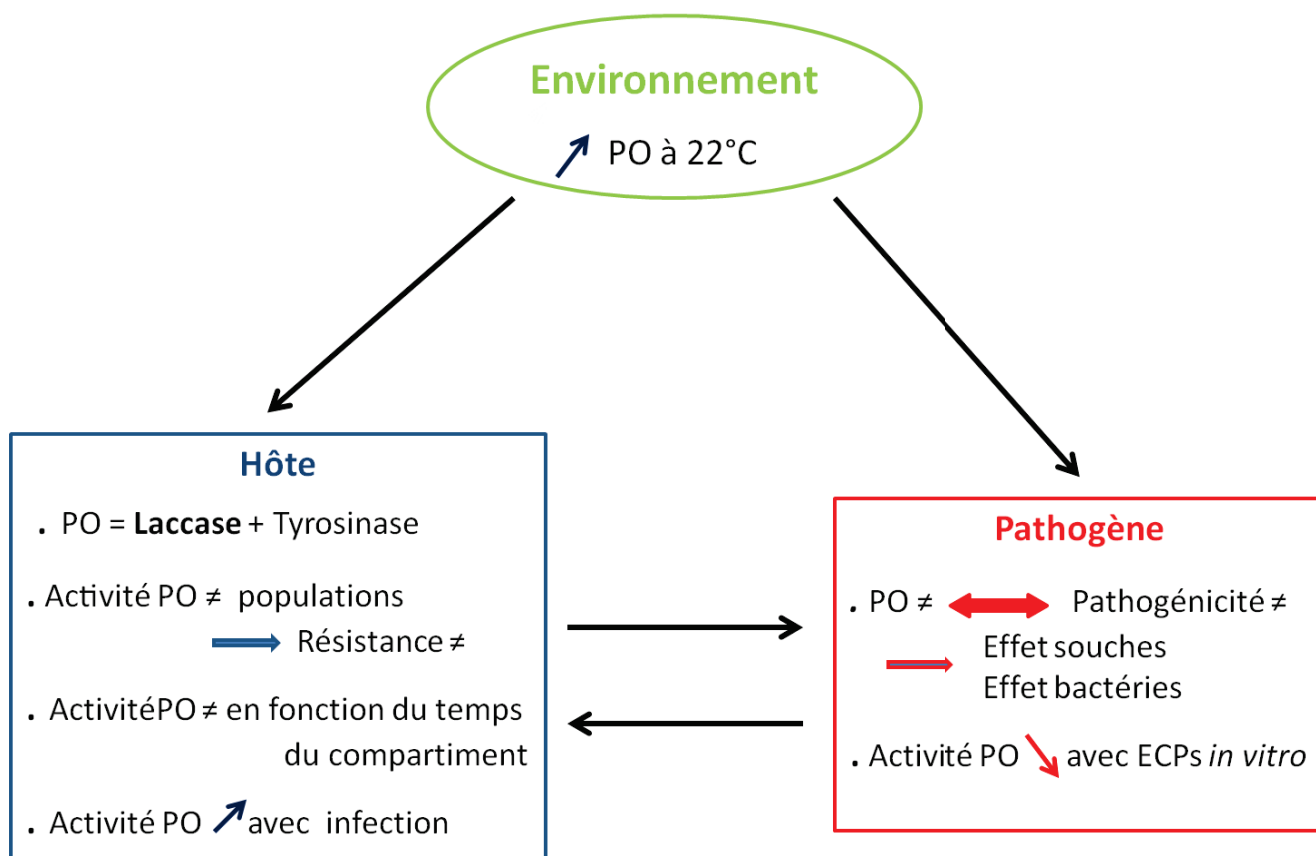


Figure 42. Contribution de mon travail de thèse à une meilleure connaissance du système PO dans l'interaction Hôte-Pathogène-Environnement.

En conclusion, l'utilisation du système PO comme biomarqueur potentiel gagnerait en robustesse en étant associé à d'autres biomarqueurs. En ce sens, une thèse débutée en 2012 est actuellement en cours au LEMAR (Gaëlle Richard) et porte sur le rôle des enzymes antioxydantes dans l'interaction tripartite définissant la MAB. A plus long terme, l'élaboration de profils immunitaires pourrait permettre de mettre en place des programmes de sélection visant à obtenir des individus plus résistants à la MAB mais aussi à d'autres infections ou à l'exposition à différents stress abiotiques. Réciproquement, l'interprétation de différents profils immunitaires pourrait être utilisée pour évaluer l'état de l'environnement dans lequel se trouvent les palourdes.

Bibliographie

A

Aaslyng, D., Roerbaek, K., Soerensen, N.H., 1996. An enzyme for dyeing keratinous fibres. WO Patent App. PCT/DK1996/000,498.

Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*, in: P. Lester (Ed.), Methods in Enzymology. Academic Press, 121-126.

Aguirre-Guzmán, G., Mejia Ruíz, H., Ascencio, F., 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. Aquaculture Research 35, 1395-1404.

Aladaileh, S., Rodney, P., Nair, S.V., Raftos, D.A., 2007. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 148, 470-480.

Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. Developmental & Comparative Immunology 25, 365-375.

Allam, B., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge. Fish & shellfish immunology 20, 374-383.

Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 2000a. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. Journal of invertebrate pathology 76, 63-69.

Allam, B., Paillard, C., Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. Diseases of aquatic organisms 48, 221-231.

Allam, B., Paillard, C., Howard, A., Le Pennec, M., 2000b. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. Diseases of aquatic organisms 41, 105-113.

Allam, B., Paillard, C., Maes, P., 1996. Localization of the pathogen *Vibrio* P 1 in clams affected by brown ring disease. Diseases of aquatic organisms 27, 149-155.

Amparyup, P., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2009. Two prophenoloxidasases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Developmental & Comparative Immunology 33, 247-256.

Andersen, S., Peter, M., Roepstorff, P., 1996. Cuticular sclerotization in insects. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 113, 689-705.

Andersen, S.O., 1978. Characterization of a trypsin-solubilized phenoloxidase from locust cuticle. Insect biochemistry 8, 143-148.

Andersen, S.O., 1981. The stabilization of locust cuticle. Journal of insect physiology 27, 393-396.

Andersen, S.O., 2010. Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 166-178.

Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., Kanost, M.R., Kramer, K.J., 2005. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11337-11342.

Arias, M.E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A.S., Hernández, M., 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and environmental microbiology* 69, 1953-1958.

Artes, F., Castaner, M., Gil, M., 1998. Review: Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Food Science and Technology International* 4, 377-389.

Artigaud, S., Gauthier, O., Pichereau, V., 2013. Identifying differentially expressed proteins in two-dimensional electrophoresis experiments: inputs from transcriptomics statistical tools. *Bioinformatics* 29, 2729-2734.

Asada, N., Sezaki, H., 1999. Properties of phenoloxidases generated from prophenoloxidase with 2-propanol and the natural activator in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical genetics* 37, 149-158.

Asokan, R., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Developmental & Comparative Immunology* 21, 1-12.

Aspan, A., Huang, T.-S., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1995. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 939-943.

Aspán, A., Söderhäll, K., 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect biochemistry* 21, 363-373.

Ayres, J.S., Schneider, D.S., 2008. A signaling protease required for melanization in *Drosophila* affects resistance and tolerance of infections. *PLoS biology* 6, e305.

B

Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodriguez, J., 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132, 17-32.

Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicology in Vitro* 22, 1610-1617.

Bai, G., Brown, J.F., Watson, C., Yoshino, T.P., 1997. Isolation and characterization of phenoloxidase from egg masses of the gastropod mollusc, *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 118, 463-469.

Bailey, M., Christoforidou, Z., Lewis, M., 2013. Evolution of immune systems: Specificity and autoreactivity. *Autoimmunity Reviews* 12, 643-647.

Ballarin, L., Franchi, N., Schiavon, F., Tosatto, S.C.E., Mičetić, I., Kawamura, K., 2012. Looking for putative phenoloxidases of compound ascidians: Haemocyanin-like proteins in *Polyandrocarpa misakiensis* and *Botryllus schlosseri*. *Developmental & Comparative Immunology* 38, 232-242.

Barbey, C., Budin-Verneuil, A., Cauchard, S., Hartke, A., Laugier, C., Pichereau, V., Petry, S., 2009. Proteomic analysis and immunogenicity of secreted proteins from *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Veterinary microbiology* 135, 334-345.

Barrett, F., Andersen, S., 1981. Phenoloxidases in larval cuticle of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Insect biochemistry* 11, 17-23.

Barrett, F.M., 1991. Phenoloxidases and the integument. CSIRO Publications: Melbourne, Australia.

Beckage, N.E., 2008. Parasitoid polydnviruses and insect immunity. *Insect Immunology*, 243-270.

Becker, G., Seufert, J., Bogdahn, U., Reichmann, H., Reiners, K., 1995. Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology* 45, 182-184.

Beltramini, M., Salvato, B., Santamaria, M., Lerch, K., 1990. The reaction of CN^- with the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: its relevance for a comparison between tyrosinase and hemocyanin active sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1040, 365-372.

Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M., Rosenberg, E., 2003. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Applied and environmental microbiology* 69, 4236-4242.

Bertrand, G., 1896. Simultaneous occurrence of laccase and tyrosinase in the juice of some mushrooms. *Compte rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences* 123, 463-465.

Bezemer, B., Butt, D., Nell, J., Adlard, R., Raftos, D., 2006. Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish & shellfish immunology* 20, 627-636.

Bollag, J.-M., Chu, H.-L., Rao, M., Gianfreda, L., 2003. Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. *Journal of environmental quality* 32, 63-69.

Borcard, D., Legendre, P., 2002. All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecological Modelling* 153, 51-68.

Borrego, J.J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M.T., Ventosa, A., 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. International journal of systematic bacteriology 46, 480-484.

Boulton, M., Rózanowska, M., Rózanowski, B., 2001. Retinal photodamage. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 64, 144-161.

Bourne, N., 1982. Distribution, reproduction, and growth of Manila clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeves), in British Columbia [Canada]. Journal of Shellfish Research 2.

Brack, A., Hellmann, N., Decker, H., 2008. Kinetic Properties of Hexameric Tyrosinase from the Crustacean *Palinurus elephas*†. Photochemistry and photobiology 84, 692-699.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72, 248-254.

Bramble, L., Anderson, R.S., 1997. Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. Developmental & Comparative Immunology 21, 337-348.

Breber, P., 1985. L'introduzione e l'allevamento in Italia dell'Arsella del Pacifico, *Tapes semidecussatus* Reeve (*Bivalvia: Veneridae*). Oebalia 11, 675-680.

Brulle, F., Jeffroy, F., Madec, S., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2012. Transcriptomic analysis of *Ruditapes philippinarum* hemocytes reveals cytoskeleton disruption after *in vitro* *Vibrio tapetis* challenge. Developmental & Comparative Immunology 38, 368-376.

Buggé, D.M., Hégaret, H., Wikfors, G.H., Allam, B., 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. Fish & shellfish immunology 23, 188-196.

Burks, C.S., Fuchs, M.S., 1995. Partial purification of plasma phenoloxidase of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 110, 641-647.

Butt, D., Raftos, D., 2008. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. Developmental & Comparative Immunology 32, 299-306.

Butt, D., Shaddick, K., Raftos, D., 2006. The effect of low salinity on phenoloxidase activity in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. Aquaculture 251, 159-166.

C

Calvez, I., 2003. Approche de la variabilité spatiale d'une population de palourdes *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), aux stades larvaires et post-larvaires. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest.

Campello, S., Beltramini, M., Giordano, G., Di Muro, P., Marino, S., Bubacco, L., 2008. Role of the tertiary structure in the diphenol oxidase activity of *Octopus vulgaris* hemocyanin. Archives of biochemistry and biophysics 471, 159-167.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy research and technique* 57, 469-476.

Carballal, M.a.J., Villalba, A., López, C., 1998. Seasonal Variation and Effects of Age, Food Availability, Size, Gonadal Development, and Parasitism on the Hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of invertebrate pathology* 72, 304-312.

Casadevall, A., Pirofski, L.-a., 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity* 67, 3703-3713.

Castro, D., Martinez-Manzanares, E., Luque, A., Fouz, B., Moriñigo, M., Borrego, J., Toranzo, A., 1992. Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. *Diseases of aquatic organisms* 14, 229-236.

Castro, D., Romalde, J.L., Vila, J., Magarinos, B., Luque, A., Borrego, J.J., 1997. Intraspecific characterization of *Vibrio tapetis* strains by use of pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and plasmid profiling. *Applied and environmental microbiology* 63, 1449-1452.

Cerenius, L., Babu, R., Söderhäll, K., Jiravanichpaisal, P., 2010. *In vitro* effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *Journal of invertebrate pathology* 103, 21-23.

Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in immunology* 29, 263-271.

Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews* 198, 116-126.

Cesari, P., Pellizzato, M., 1990. *Tapes philippinarum*: biologia e sperimentazione. Ente di Sviluppo Agricolo Veneto, Ch. Biologia di *Tapes philippinarum*, 21-46.

Cesarini, J., 1996. Melanins and their possible roles through biological evolution. *Advances in Space Research* 18, 35-40.

Chen, J.-C., Chen, W.-C., 2000. Salinity tolerance of *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity and temperature levels. *Aquaculture* 181, 191-203.

Cheng, T., 1981. Bivalves. *Invertebrate blood cells* 1, 233-300.

Cheng, T.C., 1984. A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences, *Invertebrate Blood*. Springer, 111-146.

Cheng, W., Chen, J.-C., 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & shellfish immunology* 10, 387-391.

Cheng, W., Hsiao, I.-S., Chen, J.-C., 2004a. Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Diseases of aquatic organisms* 60, 157-164.

- Cheng, W., Hsiao, I., Chen, J.-C., 2004b. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & shellfish immunology* 17, 193-202.
- Cheng, W., Hsiao, I., Hsu, C.-H., Chen, J.-C., 2004c. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & shellfish immunology* 17, 235-243.
- Cheng, W., Juang, F.-M., Chen, J.-C., 2004d. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish & shellfish immunology* 16, 295-306.
- Cheng, W., Li, C.-H., Chen, J.-C., 2004e. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 232, 103-115.
- Cherqui, A., Duvic, B., Brehelin, M., 1996. Purification and characterization of prophenoloxidase from the haemolymph of *Locusta migratoria*. *Archives of insect biochemistry and physiology* 32, 225-235.
- Choquet, G., 2004. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise. Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms* 57, 109-116.
- Christensen, B.M., Li, J., Chen, C.-C., Nappi, A.J., 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends in parasitology* 21, 192-199.
- Chu, F.-L.E., 1988. Humoral defense factors in marine bivalves. *American Fisheries Society Special Publications* 18, 178-188.
- Chu, F.-L.E., La Peyre, J.F., 1989. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of invertebrate pathology* 54, 224-232.
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G., Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish & shellfish immunology* 10, 677-693.
- Colquhoun, D.J., Sørum, H., 2001. Temperature dependent siderophore production in *Vibrio salmonicida*. *Microbial Pathogenesis* 31, 213-219.
- Cong, R., Sun, W., Liu, G., Fan, T., Meng, X., Yang, L., Zhu, L., 2005. Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish & shellfish immunology* 18, 61-70.

Connors, V.A., Yoshino, T.P., 1990. *In vitro* effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. The Journal of parasitology, 895-902.

Cônsoli, F.L., Vinson, S.B., 2002. Hemolymph of reproductives of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae)—amino acids, proteins and sugars. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 132, 711-719.

Corporeau, C., Vanderplancke, G., Boulais, M., Suquet, M., Quéré, C., Boudry, P., Huvet, A., Madec, S., 2012. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Journal of proteomics 75, 5554-5563.

D

Dawley, R.M., Flurkey, W.H., 1993. Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexyl-resorcinol, a tyrosinase inhibitor. Phytochemistry 33, 281-284.

De Gregorio, E., Han, S.-J., Lee, W.-J., Baek, M.-J., Osaki, T., Kawabata, S.-I., Lee, B.-L., Iwanaga, S., Lemaitre, B., Brey, P.T., 2002. An Immune-Responsive Serpin Regulates the Melanization Cascade in *Drosophila*. Developmental cell 3, 581-592.

Deaton, L.E., Jordan, P.J., Dankert, J.R., 1999. Phenoloxidase activity in the hemolymph of bivalve mollusks. Journal of Shellfish Research 18, 223-226.

Decker, H., Jaenicke, E., 2004. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. Developmental & Comparative Immunology 28, 673-687.

Decker, H., Rimke, T., 1998. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. Journal of Biological Chemistry 273, 25889-25892.

Decker, H., Terwilliger, N., 2000. Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. Journal of Experimental Biology 203, 1777-1782.

Decker, H., Tuzek, F., 2000. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. Trends in biochemical sciences 25, 392-397.

Defoirdt, T., Darshanee Ruwandeepika, H., Karunasagar, I., Boon, N., Bossier, P., 2010. Quorum sensing negatively regulates chitinase in *Vibrio harveyi*. Environmental microbiology reports 2, 44-49.

Devauchelle, N., 1990. *Tapes philippinarum* : biologia e sperimentazione. Ente di sviluppo agricolo, capitolo 3 : sviluppo sessuale e maturità di *Tapes philippinarum*, 49-62.

Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y.-C., Gorman, M.J., Kramer, K.J., Kanost, M.R., 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 34, 29-41.

Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.-S., Soudant, P., 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. Aquaculture 297, 10-24.

Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Duffy, J.E., Barry, J.P., Chan, F., English, C.A., Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, A.B., Knowlton, N., 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. *Marine Science* 4, 11-37.

Du Pasquier, L., 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 129, 1-15.

Duran, N., Esposito, E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied catalysis B: environmental* 28, 83-99.

Duvic, B., Söderhall, K., 1992. Purification and partial characterization of a β -1, 3-glucan-binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *European Journal of Biochemistry* 207, 223-228.

Duvic, B., Söderhäll, K., 1990. Purification and characterization of a beta-1, 3-glucan binding protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry* 265, 9327-9332.

E

Eicken, C., Krebs, B., Sacchettini, J.C., 1999. Catechol oxidase—structure and activity. *Current Opinion in Structural Biology* 9, 677-683.

Eleftherianos, I., Boundy, S., Joyce, S.A., Aslam, S., Marshall, J.W., Cox, R.J., Simpson, T.J., Clarke, D.J., Reynolds, S.E., 2007. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2419-2424.

Espín, J.C., Varón, R., Fenoll, L.G., Gilabert, M., García-Ruíz, P.A., Tudela, J., García-Cánovas, F., 2000. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *European Journal of Biochemistry* 267, 1270-1279.

F

Fan, T.-J., Wang, X.-F., 2002. Purification and partial biochemical characterization of phenoloxidase from *Penaeus chinensis*. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica* 34, 589-594.

Fan, T., Zhang, Y., Yang, L., Yang, X., Jiang, G., Yu, M., Cong, R., 2009. Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenoloxidase from the crab *Charybdis japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 152, 144-149.

Fang, F.C., 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology* 2, 820-832.

FAO, 2013. FAO - Food and agriculture Organization, Fisheries Statistics.

Faria, J.C., Jelihovschi, E., Allaman, I.B., 2012. TukeyC: Conventiönnal Tukey Test. R package version 1. 1-0.

Faucheux, B.A., Martin, M.-E., Beaumont, C., Hauw, J.-J., Agid, Y., Hirsch, E.C., 2003. Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 86, 1142-1148.

Faure, D., Bouillant, M., Bally, R., 1995. Comparative Study of Substrates and Inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* Laccases. *Applied and environmental microbiology* 61, 1144-1146.

Fisher, W., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes, *Immunity in invertebrates*. Springer, 25-35.

Flassch, J.-P., Barret, J., Mazurie, J., Maes, P., Nicolas, J., Noel, T., Paillard, C., Le Pennec, M., 1992. L'élevage de la palourde, programme national de recherche sur la maladie de l'anneau brun, Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture, Brest (France), 9 Nov 1990.

Flassch, J.-P., Leborgne, Y., 1992. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement, Introductions and Transfers of Aquatic species. Selected papers from a Symposium Held in Halifax, Nova Scotia, 12-13 June 1990.

Flurkey, A., Cooksey, J., Reddy, A., Spoonmore, K., Rescigno, A., Inlow, J., Flurkey, W.H., 2008. Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase preparations: potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 4760-4768.

Flye-Sainte-Marie, J., Jean, F., Paillard, C., Ford, S., Powell, E., Hofmann, E., Klinck, J., 2007. Ecophysiological dynamic model of individual growth of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 266, 130-143.

Flye-Sainte-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goïc, N., Goncalvez, M., Travers, M.-A., Paillard, C., Jean, F., 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 377, 1-11.

Flye-Sainte-Marie, J.G., 2007. Ecophysiology of brown ring disease in the manila clam *Ruditapes philippinarum*, experimental and modelling approaches. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 140.

Ford, S.E., Paillard, C., 2007. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Fish & shellfish immunology* 23, 280-291.

Frizzo, A., Guidolin, L., Ballarin, L., Sabbadin, A., 1999. Purification and partial characterisation of phenoloxidase from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Marine Biology* 135, 483-488.

Führer, E., Willers, D., 1986. The anal secretion of the endoparasitic larva *Pimpla turionellae*: Sites of production and effects. *Journal of insect physiology* 32, 361-367.

Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S., Iwanaga, S., Ohnishi, E., 1995. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences 92, 7769-7773.

G

Galka, F., Wai, S.N., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Uhlin, B.E., Steinert, M., 2008. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. Infection and Immunity 76, 1825-1836.

Galko, M.J., Krasnow, M.A., 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. PLoS biology 2, e239.

García-Carreño, F.L., Cota, K., Navarrete del Toro, M.a.A., 2008. Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. Journal of agricultural and food chemistry 56, 6454-6459.

Genthner, F.J., Volety, A.K., Oliver, L.M., Fisher, W.S., 1999. Factors influencing *in vitro* killing of bacteria by hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Applied and environmental microbiology 65, 3015-3020.

Gibb, W., Fearnley, J., Lees, A., 1990. The anatomy and pigmentation of the human substantia nigra in relation to selective neuronal vulnerability. Advances in neurology 53, 31.

Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997. Biological mediators of insect immunity. Annual review of entomology 42, 611-643.

Giménez, B., Martínez-Alvarez, Ó., Montero, P., Gómez-Guillén, M.d.C., 2010. Characterization of phenoloxidase activity of carapace and viscera from cephalothorax of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). LWT-Food Science and Technology 43, 1240-1245.

Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F., 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 122, 77-82.

Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L., Doucet, O., 2004. Cosmetic and dermatological preparation containing copper-binding proteins for skin lightening. International Patent Application, WO2004017931.

Gomez-Jimenez, S., Uglow, R.F., Gollas-Galvan, T., 2000. The effects of cooling and emersion on total haemocyte count and phenoloxidase activity of the spiny lobster *Panulirus interruptus*. Fish & shellfish immunology 10, 631-635.

Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Huang, W.-B., Wang, K.-J., 2009. Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo (a) pyrene. Chemosphere 75, 389-397.

Goulletquer, P., 1989. Etude des facteurs environnementaux intervenant sur la production de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. Université de Bretagne Occidentale.

Goulletquer, P., 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Ruditapes philippinarum*, FAO Fisheries and Aquaculture Department [online], Rome.

Grégoire, C., Duchateau, G., Florkin, M., 1954. La trame protidique des nacres. *Experientia* 10, 37-40.

Guévelou, E., Huvet, A., Galindo-Sánchez, C.E., Milan, M., Quillien, V., Daniel, J.-Y., Quéré, C., Boudry, P., Corporeau, C., 2013. Sex-Specific Regulation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Biology of reproduction, biolreprod.* 113.109728.

Guo, D., Zhang, Y., Zeng, D., Wang, H., Li, X., Li, Y., Fan, X., 2009. Functional properties of hemocyanin from *Oncomelania hupensis*, the intermediate host of *Schistosoma japonicum*. *Experimental Parasitology* 123, 277-281.

Gurme, S.T., Surwase, S.N., Patil, S.A., Jadhav, S.B., Jadhav, J.P., 2013. Optimization of Biotransformation of l-Tyrosine to l-DOPA by *Yarrowia lipolytica*-NCIM 3472 Using Response Surface Methodology. *Indian Journal of Microbiology*, 53, 194-198.

H

Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., Samuel, M.D., 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296, 2158-2162.

Hata, S., Azumi, K., Yokosawa, H., 1998. Ascidian phenoloxidase: its release from hemocytes, isolation, characterization and physiological roles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 119, 769-776.

Hattori, M., Konishi, H., Tamura, Y., Konno, K., Sogawa, K., 2005. Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Journal of insect physiology* 51, 1359-1365.

Hauton, C., Hawkins, L., Williams, J., 1995. Circatidal rhythmicity in the activity of the phenoloxidase enzyme in the common shore crab, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 111, 347-352.

Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 477-483.

Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish & shellfish immunology* 22, 433-440.

Helm, M., 1990. Hatchery design and general principles of operation and management and new development. *Tapes philippinarum*. *Biologia e sperimentazione*, Ente Sviluppo Agricolo Veneto, Legnaro (PD), Italy, 63-69.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and adaptation* 1, 319-366.

Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 113, 61-66.

Hird, M.J., 2010. Coevolution, symbiosis and sociology. Ecological Economics 69, 737-742.

Hirsch, E., Graybiel, A.M., Agid, Y.A., 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. Nature 334, 345-348.

Hoebe, K., Janssen, E., Beutler, B., 2004. The interface between innate and adaptive immunity. Nature immunology 5, 971-974.

Howe, H.F., Smallwood, J., 1982. Ecology of seed dispersal. Annual review of ecology and systematics 13, 201-228.

Howland, K.H., Cheng, T.C., 1982. Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. Journal of invertebrate pathology 39, 123-132.

Huang, J., Yang, Y., Wang, A., 2010. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & shellfish immunology 28, 240-244.

Huchette, S., Clavier, J., 2004. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. Journal of Shellfish Research 23, 951-956.

Humphreys, J., Caldow, R.W., McGrorty, S., West, A.D., Jensen, A.C., 2007. Population dynamics of naturalised Manila clams *Ruditapes philippinarum* in British coastal waters. Marine Biology 151, 2255-2270.

I

Idakieva, K., Raynova, Y., Meersman, F., Gielens, C., 2013. Phenoloxidase activity and thermostability of *Cancer pagurus* and *Limulus polyphemus* hemocyanin. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 164, 201-209.

J

Jaenicke, E., Decker, H., 2003. Tyrosinases from crustaceans form hexamers. Biochemical Journal 371, 515-523.

Jaenicke, E., Fraune, S., May, S., Irmak, P., Augustin, R., Meesters, C., Decker, H., Zimmer, M., 2009. Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice? Developmental & Comparative Immunology 33, 1055-1063.

Janeway Jr, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. Science Signaling 20, 197.

Jayaraj, S.S., Thiagarajan, R., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 2008. Isolation, purification and characterization of β -1,3-glucan binding protein from the plasma of marine mussel *Perna viridis*. Fish & shellfish immunology 24, 715-725.

Jeffroy, F., 2011. Production et caractérisation de familles de palourdes japonaises, *Ruditapes philippinarum*, résistantes à la maladie de l'anneau brun. Université de Bretagne occidentale, Brest.

Jeffroy, F., Brulle, F., Paillard, C., 2013. Differential expression of genes involved in immunity and biomineralization during Brown Ring Disease development and shell repair in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Journal of invertebrate pathology 113, 129-136.

Jeffroy, F., Paillard, C., 2011. Involvement of nitric oxide in the *in vitro* interaction between Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*. Fish & shellfish immunology 31, 1137-1141.

Jellinger, K., Paulus, W., Grundke-Iqbal, I., Riederer, P., Youdim, M., 1990. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. Journal of Neural Transmission-Parkinson's Disease and Dementia Section 2, 327-340.

Jensen, S., Samuelsen, O.B., Andersen, K., Torkildsen, L., Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C., Bergh, Ø., 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkscrew wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. Diseases of aquatic organisms 53, 25-31.

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology 211, 213-236.

Johansson, M.W., Holmblad, T., Thornqvist, P.-O., Cammarata, M., Parrinello, N., Soderhall, K., 1999. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish. Journal of cell science 112, 917-925.

Johansson, M.W., Lind, M.I., Holmblad, T., Thornqvist, P.O., Soderhall, K., 1995. Peroxinectin, a Novel Cell Adhesion Protein from Crayfish Blood. Biochemical and Biophysical Research Communications 216, 1079-1087.

Johansson, M.W., Soderhall, K., 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitology Today 5, 171-176.

Johansson, M.W., Söderhäll, K., 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. Journal of Comparative Physiology B 156, 175-181.

Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G., 1998. Agaricus bisporus browning: a review. Mycological Research 102, 1459-1483.

Jones, G., Sanford, C.L., Jones, B., 1993. Manila clams: hatchery and nursery methods. Innovative Aquaculture Products Limited.

K

Kang, D.-Y., Kim, H.-C., 2013. Functional characterization of two melanin-concentrating hormone genes in the color camouflage, hypermelanosis, and appetite of starry flounder. General and Comparative Endocrinology 189, 74-83.

Kanost, M.R., Jiang, H., Wang, Y., Yu, X.-Q., Ma, C., Zhu, Y., 2001. Hemolymph proteinases in immune responses of *Manduca sexta*, Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System. Springer, 319-328.

Kanost, M.R., Jiang, H., Yu, X.-Q., 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. Immunological reviews 198, 97-105.

Karlson, P., Sekeris, C.E., 1962. N-acetyl-dopamine as sclerotizing agent of the insect cuticle. Nature 195, 183-184.

Kim, W., Huh, H., Lee, J.-H., Rumohr, H., Koh, C., 1999. Endogenous circatidal rhythm in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). Marine Biology 134, 107-112.

Kim, Y.-J., Uyama, H., 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 62, 1707-1723.

Klebanoff, S.J., 1982. Oxygen-dependent cytotoxic mechanisms of phagocytes. Advances in host defense mechanisms 1, 111-162.

Korytowski, W., Sarna, T., Zareba, M., 1995. Antioxidant action of neuromelanin: the mechanism of inhibitory effect on lipid peroxidation. Archives of biochemistry and biophysics 319, 142-148.

Kurtz, J., 2004. Memory in the innate and adaptive immune systems. Microbes and infection 6, 1410-1417.

Kurtz, J., 2005. Specific memory within innate immune systems. Trends in immunology 26, 186-192.

Kurtz, J., Franz, K., 2003. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. Nature 425, 37-38.

L

Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., Nicolas, J.-L., 2006. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. Developmental & Comparative Immunology 30, 367-379.

Lacoue-Labarthe, T., Bustamante, P., Hörlin, E., Luna-Acosta, A., Bado-Nilles, A., Thomas-Guyon, H., 2009. Phenoloxidase activation in the embryo of the common cuttlefish *Sepia officinalis* and responses to the Ag and Cu exposure. Fish & shellfish immunology 27, 516-521.

Lai-Fook, J., 1966. The repair of wounds in the integument of insects. Journal of insect physiology 12, 195-226.

- Lambert, C., Chacon, J.N., Chedekel, M.R., Land, E.J., Riley, P.A., Thompson, A., Truscott, T.G., 1989. A pulse radiolysis investigation of the oxidation of indolic melanin precursors: evidence for indolequinones and subsequent intermediates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 993, 12-20.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & shellfish immunology* 15, 225-240.
- Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J., Samain, J.-F., 2007. *In vitro* modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. *Aquaculture* 270, 413-421.
- Lambrecht, H., 1995. Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods, ACS Symposium Series. ACS Publications, 313-324.
- Lang, G., Cotteret, J., 1999. Hair dye composition containing a laccase.(L'Oreal, Fr.). International Patent Application, WO9936036.
- Laruelle, F., 1999. Phénologie et déterminisme de la reproduction chez *Ruditapes decussatus* (L.) et *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve) en Bretagne.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1295-1309.
- Le Grand, F., Kraffe, E., Marty, Y., Donaghy, L., Soudant, P., 2011. Membrane phospholipid composition of hemocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 159, 383-391.
- Le Pennec, M., 1978. Genèse de la coquille larvaire et postlarvaire chez divers bivalves marins. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 108.
- Lecointre, G., Le Guyader, H., Visset, D., 2001. Classification phylogénétique du vivant. Belin Paris.
- Lee, C.-Y., Cheng, M.-F., Yu, M.-S., Pan, M.-J., 2002a. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS microbiology letters* 209, 31-37.
- Lee, K., Liu, P., Chuang, W., 2002b. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology* 4, 267-277.
- Lee, S.-K., George, S.D., Antholine, W.E., Hedman, B., Hodgson, K.O., Solomon, E.I., 2002c. Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *Journal of the american chemical society* 124, 6180-6193.

Lee, S.Y., Wang, R., Söderhäll, K., 2000. A Lipopolysaccharide-and β -1, 3-Glucan-binding Protein from Hemocytes of the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Journal of Biological Chemistry 275, 1337-1343.

Liang, Z., Sottrup-Jensen, L., Aspán, A., Hall, M., Söderhäll, K., 1997. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. Proceedings of the National Academy of Sciences 94, 6682-6687.

Lillie, R., 1955. The basophilia of melanins. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 3, 453-454.

Lillie, R., 1957. Metal reduction reactions of the melanins: histochemical studies. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 5, 325-333.

Liu, C.-H., Chen, J.-C., 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish & shellfish immunology 16, 321-334.

Liu, G., Yang, L., Fan, T., Cong, R., Tang, Z., Sun, W., Meng, X., Zhu, L., 2006. Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*. Fish & shellfish immunology 20, 47-57.

Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2007. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. Journal of Biological Chemistry 282, 33593-33598.

Liu, P.V., 1957. Survey of hemolysin production among species of pseudomonads. Journal of bacteriology 74, 718-727.

Lockey, T.D., Ourth, D.D., 1992. Isolation and characterization of hemolymph phenoloxidase from *Heliothis virescens* larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry 102, 891-896.

Lopez, J., Balboa, S., Nunez, S., De la Roca, E., De la Herran, R., Navas, J., Toranzo, A., Romalde, J., 2011. Characterization of *Vibrio tapetis* strains isolated from diseased cultured Wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau). Research in Veterinary Science 90, 189-195.

Luna-Acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., 2010. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish & Shellfish Immunology 28, 719-726.

Luna-Acosta, A., Saulnier, D., Pommier, M., Haffner, P., De Decker, S., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2011. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. Fish & shellfish immunology 31, 795-800.

Luna-González, A., Maeda-Martínez, A.N., Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F., Robles-Mungaray, M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. Fish & shellfish immunology 15, 275-282.

Luna Acosta, A., 2010. Les phénoloxydases chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: biomarqueurs potentiels de stress environnemental. Université de La Rochelle.

Luo, Y., Barbosa-Canovas, G., 1997. Enzymatic browning and its inhibition in new apple cultivars slices using 4-hexylresorcinol in combination with ascorbic acid/Pardeamiento enzimático y su inhibición en rodajas de manzanas de nuevas variedades utilizando 4-hexilresorcinol en combinación con ácido ascórbico. Food Science and Technology International 3, 195-201.

Luo, Y., Barbosa-Cánovas, G.V., 1995. Inhibition of apple-slice browning by 4-hexylresorcinol, ACS Symposium Series. ACS Publications, 240-250.

M

Maes, P., Paillard, C., 1992. Effect du *Vibrio* P1, pathogene de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres especes de bivalves, Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture, Brest (France), 9 Nov 1990.

Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. The Lancet 361, 743-749.

Malek, S., 1957. Sclerotization and melanization: two independent processes in the cuticle of the desert locust. Nature 180, 237.

Manikandan, B., Ramar, M., 2012. Detection of natural and induced phenoloxidase activities in human serum. Human Immunology 73, 1005-1010.

Mann, D., Yates, P., 1974. Lipoprotein pigments—their relationship to ageing in the human nervous system I. The lipofuscin content of nerve cells. Brain 97, 481-488.

Mann, V., Cooper, J., Daniel, S., Srai, K., Jenner, P., Marsden, C., Schapira, A., 1994. Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. Annals of neurology 36, 876-881.

Mao Che, L., Golubic, S., Le Campion-Alsumard, T., Payri, C., 2001. Developmental aspects of biomineralisation in the Polynesian pearl oyster *Pinctada margaritifera* var. *cumingii*. Oceanologica Acta 24, Supplement 1, 37-49.

Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovic, D., 2008. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. Current topics in developmental biology 80, 209-276.

Mat, A.M., Massabuau, J.-C., Ciret, P., Tran, D., 2012. Evidence for a Plastic Dual Circadian Rhythm in the Oyster *Crassostrea gigas*. Chronobiology international 29, 857-867.

Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., Sugiyama, M., 2006. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. Journal of Biological Chemistry 281, 8981-8990.

Matsuyama, T., Sakai, T., Kiryu, I., Yuassa, K., Yasunobu, H., Kawamura, Y., Sano, M., 2010. First isolation of *Vibrio tapetis*, the Etiological Agent of Brown Ring Disease (BRD), in Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. *Fish Pathology* 45, 77-79.

McCord, J.D., Kilara, A., 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Science* 48, 1479-1484.

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055.

McEvily, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S., 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 32, 253-273.

McFall-Ngai, M., Nyholm, S.V., Castillo, M.G., 2010. The role of the immune system in the initiation and persistence of the *Euprymna scolopes*–*Vibrio fischeri* symbiosis, *Seminars in immunology*. Elsevier, 48-53.

Mendes, R., Pestana, J., Pestana, C., 2006. Changes in 4-hexylresorcinol residues during processing of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *European Food Research and Technology* 223, 509-515.

Mikolasch, A., Niedermeyer, T.H.J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., Gesell, M., Hessel, S., Jülich, W.-D., 2006. Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from *Trametes spec.* *Chemical and pharmaceutical bulletin* 54, 632-638.

Montero, P., Avalos, A., Perez-Mateos, M., 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). *Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment*. *Food Chemistry* 75, 317-324.

Morgan, T., Thomas, B., Yonekura, M., Czapla, T., Kramer, K., Hopkins, T., 1990. Soluble tyrosinases from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Insect biochemistry* 20, 251-260.

Morse, M.P., Meyhofer, E., Otto, J.J., Kuzirian, A.M., 1986. Hemocyanin respiratory pigment in bivalve mollusks. *Science* 231, 1302-1304.

Mortensen, S.H., Strand, Ø., Høisæter, T., 2000. Releases and recaptures of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) introduced to Norway. *Sarsia* 85, 87-91.

Mottin, E., Caplat, C., Mahaut, M.-L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.-M., Serpentine, A., 2010. Effect of *in vitro* exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Fish & shellfish immunology* 29, 846-853.

N

Nakazawa, K., Sahuc, F., Damour, O., Collombel, C., Nakazawa, H., 1998. Regulatory effects of heat on normal human melanocyte growth and melanogenesis: comparative study with UVB. *Journal of investigative dermatology* 110, 972-977.

Nappi, A., Frey, F., Carton, Y., 2005. *Drosophila* serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response. *Journal of insect physiology* 51, 197-205.

Nelson, D.L., 2010. *Lehninger principles of biochemistry*, Fifth edition Macmillan Publishers Ltd England.

Netea, Mihai G., Quintin, J., van der Meer, Jos W.M., 2011. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host & Microbe* 9, 355-361.

Newton, K., Peters, R., Raftos, D., 2004. Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Developmental & Comparative Immunology* 28, 565-569.

Nicolas, J.-L., Basuyaux, O., Mazurie, J., Thebault, A., 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of aquatic organisms* 50, 35-43.

Noël, D., Bachère, E., Mialhe, E., 1993. Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Developmental & Comparative Immunology* 17, 483-493.

O

Oubella, R., Maes, P., Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 1996. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquatic Living Resources* 9, 137-143.

Oubella, R., Paillard, C., Maes, P., Auffret, M., 1994. Changes in Hemolymph Parameters in the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) Following Bacterial Challenge. *Journal of invertebrate pathology* 64, 33-38.

Ouyang, Y., Andersson, C.R., Kondo, T., Golden, S.S., Johnson, C.H., 1998. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 8660-8664.

P

Paillard, C., 1992. Etiologie et caracterisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'elevage *Ruditapes philippinarum*. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 296.

Paillard, C., 2004a. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilitation à diriger des recherches (HDR), Université de Bretagne Occidentale, Brest.

Paillard, C., 2004b. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resources* 17, 467-475.

Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms* 59, 249-262.

Paillard, C., Le Pennec, M., 1993. Ultrastructural studies of the mantle and the periostracal lamina in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Tissue and Cell* 25, 183-194.

Paillard, C., Maes, P., 1990. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie 310, 15-20.

Paillard, C., Maes, P., 1994. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. Diseases of aquatic organisms 19, 137-146.

Paillard, C., Maes, P., 1995a. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. Journal of invertebrate pathology 65, 91-100.

Paillard, C., Maes, P., 1995b. The brown ring disease in the manila clam, *Ruditapes philippinarum* II. Microscopic study of the brown ring syndrome. Journal of invertebrate pathology 65, 101-110.

Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. Annual Review of Fish Diseases 4, 219-240.

Paillard, C., Percelay, L., Le Pennec, M., Le Picard, D., 1989. Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie 309, 235-241.

Pakkenberg, B., Møller, A., Gundersen, H., Dam, A.M., Pakkenberg, H., 1991. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 54, 30-33.

Pang, Q., Liu, X., Zhao, B., Jiang, Y., Su, F., Zhang, X., Nie, M., Zhang, M., Sun, H., 2010. Detection and characterization of phenoloxidase in the freshwater planarian *Dugesia japonica*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 157, 54-58.

Parache, A., 1982. La palourde. La Pêche Maritime 1254, 496-507.

Park, J.-W., Kim, C.-H., Kim, J.-H., Je, B.-R., Roh, K.-B., Kim, S.-J., Lee, H.-H., Ryu, J.-H., Lim, J.-H., Oh, B.-H., 2007. Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 6602-6607.

Park, K.-I., Choi, K.-S., 2001. Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. Aquaculture 203, 9-22.

Park, K.-I., Choi, K.-S., 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): I. Quantifying eggs. Aquaculture 241, 667-687.

Park, K.-I., Choi, K.-S., Choi, J.-W., 1999. Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the manila clam, *Ruditapes philippinarum* in komsoe bay, korea. Journal-Korean Fisheries Society 32, 303-309.

- Park, K.-I., Paillard, C., Le Chevalier, P., Choi, K.-S., 2006. Report on the occurrence of brown ring disease (BRD) in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, on the west coast of Korea. *Aquaculture* 255, 610-613.
- Park, K.-I., Tsutsumi, H., Hong, J.-S., Choi, K.-S., 2008. Pathology survey of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* occurring on sandy tidal flats along the coast of Ariake Bay, Kyushu, Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 212-219.
- Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barracco, M.A., 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214, 19-33.
- Perru, O., 2006. Cooperation strategies, signals and symbiosis. *Comptes Rendus Biologies* 329, 928-937.
- Peters, R., Raftos, D.A., 2003. The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 223, 29-39.
- Petruzzelli, R., Goffredo, B.M., Barra, D., Bossa, F., Boffi, A., Verzili, D., Ascoli, F., Chiancone, E., 1985. Amino acid sequence of the cooperative homodimeric hemoglobin from the mollusc *Scapharca inaequivalvis* and topology of the intersubunit contacts. *FEBS letters* 184, 328-332.
- Pittendrigh, C.S., 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual Review of Physiology* 55, 17-54.
- Plana, S., 1995. Perturbations de la glande digestive et du métabolisme chez la palourde aquacole, *Ruditapes philippinarum*, affectée par la maladie de l'anneau brun. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 160.
- Plana, S., Sinquin, G., Maes, P., Paillard, C., Le Pennec, M., 1996. Variations in biochemical composition of juvenile *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio* sp. *Diseases of aquatic organisms* 24, 205-213.
- Plonka, P.M., Grabacka, M., 2006. Melanin synthesis in microorganisms—biotechnological and medical aspects.
- Pointing, S., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 20-33.
- Ponurovsky, S., Yakovlev, Y., 1992. The reproductive biology of the Japanese littleneck, *Tapes philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850)(Bivalvia: Veneridae). *Journal of Shellfish Research* 11, 265-265.
- Pörtner, H.-O., 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Marine ecology progress series* 373, 203-217.
- Prado, S., Romalde, J.L., Barja, J.L., 2010. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary microbiology* 145, 187-197.

Pronnier, F., 1996. Le développement larvaire et l'alimentation de larves de bivalves d'écloserie. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, 100.

Prota, G., 1992. Melanins and melanogenesis. Access Online via Elsevier.

Q

Quayle, D., 1964. Distribution of introduced marine Mollusca in British Columbia waters. Journal of the Fisheries Board of Canada 21, 1155-1181.

Quéro, J.-C., Vayne, J.-J., 1998. Les fruits de la mer et plantes marines des pêches françaises. Algues, plantes marines éponges, coraux, coquillages, crustacés, oursins,... Eds Delachaux et Niestlé, Les Encyclopédies du Naturaliste.

R

Radha, S., Mullainadhan, P., Arumugam, M., 2013. Detection of two distinct types of hemolymphatic prophenoloxidase and their differential responses in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, upon infection by white spot syndrome virus. Aquaculture 376–379, 76-84.

Reid, H.I., Duncan, H.L., Laidler, L.A., Hunter, D., Birkbeck, T.H., 2003. Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture 221, 65-74.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture 191, 271-288.

Richard, G., 2012. Impact de l'exposition à *Alexandrium ostenfeldii* couplé à l'infection parasitaire par *Perkinsus olseni* sur les enzymes du système anti-oxydant de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*. Rapport de stage de master 2, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse

Richards, E.H., Edwards, J.P., 2000. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitoid, *Eulophus pennicornis*, is associated with a reduction in host haemolymph phenoloxidase activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 127, 289-298.

Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W.-D., Schmidt, B., Reynolds, G.P., Jellinger, K., Youdim, M.B., 1989. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. Journal of neurochemistry 52, 515-520.

Riley, P., 1997. Melanin. The international journal of biochemistry & cell biology 29, 1235-1239.

Rivero, A., 2006. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. Trends in parasitology 22, 219-225.

Robert, R., Deltreil, J., 1990. Elevage de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* dans le bassin d'Aracachon. Bilan des dix dernières années et perspectives de développement. Rapport internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. IFREMER.

Robert, R., Trut, G., Laborde, J., 1993. Growth, reproduction and gross biochemical composition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the Bay of Arcachon, France. *Marine Biology* 116, 291-299.

Rodríguez Couto, S., Sanromán, M., Gübitz, G., 2005. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere* 58, 417-422.

Rodríguez Couto, S., Sanroman, M., Hofer, D., Gübitz, G., 2004. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorization of dyes from a leather factory. *Engineering in life sciences* 4, 233-238.

Rompel, A., Fischer, H., Meiwes, D., Zippel, F., Nolting, H.-F., Hermes, C., Krebs, B., Witzel, H., 1995. Spectroscopic and EXAFS studies on catechol oxidases with dinuclear copper centers of type 3: evidence for $[\mu]-[\eta] 2: [\eta] 2$ -peroxo-intermediates during the reaction with catechol. *Journal of Inorganic Biochemistry* 59, 715-715.

Roulin, A., Almasi, B., Meichtry-Stier, K., Jenni, L., 2011. Eumelanin- and pheomelanin-based colour advertise resistance to oxidative stress in opposite ways. *Journal of evolutionary biology* 24, 2241-2247.

Rowley, A.F., Powell, A., 2007. Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific? *The Journal of Immunology* 179, 7209-7214.

Royet, J., 2004. Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. *Molecular immunology* 41, 1063-1075.

Rózanowska, M., Sarna, T., Land, E.J., Truscott, T.G., 1999. Free radical scavenging properties of melanin: interaction of eu-and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 518-525.

S

Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., 2006. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology* 16, 1206-1210.

Salvato, B., Santamaria, M., Beltramini, M., Alzuet, G., Casella, L., 1998. The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: o-diphenol oxidase activity. *Biochemistry* 37, 14065-14077.

Santarém, M., Robledo, J.A., Figueras, A., 1994. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 18, 217-222.

Sarna, T., Pilas, B., Land, E.J., Truscott, T.G., 1986. Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 883, 162-167.

Schiel, G., Corsaro, C., Scalia, M., Sciuto, S., Geremia, E., 1987. Relationship between melanin content and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver of various species of animals. *Cell biochemistry and function* 5, 123-128.

Schulenburg, H., Boehnisch, C., Michiels, N.K., 2007. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Molecular immunology* 44, 3338-3344.

Seagle, B.-L.L., Rezai, K.A., Kobori, Y., Gasyna, E.M., Rezaei, K.A., Norris, J.R., 2005. Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8978-8983.

Shi, Y., Chen, Q.-X., Wang, Q., Song, K.-K., Qiu, L., 2005. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Food Chemistry* 92, 707-712.

Shima, T., Sarna, T., Swartz, H.M., Stroppolo, A., Gerbasi, R., Zecca, L., 1997. Binding of iron to neuromelanin of human substantia nigra and synthetic melanin: an electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 110-119.

Shlom, J.M., Vinogradov, S.N., 1973. A study of the subunit structure of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. *Journal of Biological Chemistry* 248, 7904-7912.

Siddiqui, N.I., Akosung, R.F., Gielens, C., 2006. Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348, 1138-1144.

Simonet, G., Claeys, I., Broeck, J.V., 2002. Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 132, 247-255.

Simpson, B.K., Marshall, M.R., Otwell, W.S., 1987. Phenol oxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties. *Journal of agricultural and food chemistry* 35, 918-921.

Sindermann, C.J., 1990. *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish: Diseases of Marine Fishes*. Gulf Professional Publishing.

Skálová, T., Dohnálek, J., Østergaard, L.H., Østergaard, P.R., Kolenko, P., Dušková, J., Štěpánková, A., Hašek, J., 2009. The Structure of the Small Laccase from *Streptomyces coelicolor* Reveals a Link between Laccases and Nitrite Reductases. *Journal of molecular biology* 385, 1165-1178.

Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P.M., Schallreuter, K.U., Paus, R., Tobin, D.J., 2005. Hair follicle pigmentation. *Journal of investigative dermatology* 124, 13-21.

Smith, V.J., Johnston, P.A., 1992. Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 101, 641-649.

Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current opinion in immunology* 10, 23-28.

Söderhäll, K., Cerenius, L., Johansson, M.W., 1994. The Prophenoloxidase Activating System and Its Role in Invertebrate Defence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 712, 155-161.

Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G., Hebenstreit, G., Youdim, M., 1988. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *Journal of neural transmission* 74, 199-205.

Solidoro, C., Pastres, R., Melaku Canu, D., Pellizzato, M., Rossi, R., 2000. Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in Northern Adriatic lagoons. *Marine ecology. Progress series* 199, 137-148.

Soudant, P., Paillard, C., Choquet, G., Lambert, C., Reid, H., Marhic, A., Donaghy, L., Birkbeck, T., 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*,= *Ruditapes*) *philippinarum*. *Aquaculture* 229, 401-418.

Sritunyalucksana, K., Wongsuebsantati, K., Johansson, M.W., Söderhäll, K., 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 353-363.

Stackebrandt, E., Murray, R., Trüper, H., 1988. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *International journal of systematic bacteriology* 38, 321-325.

Suderman, R.J., Dittmer, N.T., Kanost, M.R., Kramer, K.J., 2006. Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 353-365.

Sugumaran, M., 1991. Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis Comparison with insect cuticular sclerotization. *FEBS letters* 293, 4-10.

Sun, H.-s., Li, G.-y., 1999. Activity change of seven enzymes in haemolymph in scallop *Chlamys farreri* after challenge with *Escherichia coli*. *Marine Sciences* 5, 018.

T

Tanner, C.A., Burnett, L.E., Burnett, K.G., 2006. The effects of hypoxia and pH on phenoloxidase activity in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* 144, 218-223.

Team, R.C., 2013. R: A language and environment for statistical computing, in: R.F.f.S. Computing (Ed.), Vienna, Austria.

Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S., Renault, T., 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Developmental & Comparative Immunology* 33, 653-659.

Thomas, B., Yonekura, M., Morgan, T., Czapla, T., Hopkins, T., Kramer, K., 1989. A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect biochemistry* 19, 611-622.

Toranzo, A., Barja, J., Potter, S., Colwell, R., Hetrick, F., Crosa, J., 1983. Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay. *Infection and Immunity* 39, 1220-1227.

Torreilles, J., Guérin, M.-C., Roch, P., 1996. Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 319, 209-218.

Tran, D., Nadau, A., Durrieu, G., Ciret, P., Parisot, J.-P., Massabuau, J.-C., 2011. Field chronobiology of a molluscan bivalve: how the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiology international* 28, 307-317.

Travers, M.-A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J.-L., Koken, M., Paillard, C., 2009. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology* 15, 1365-1376.

Travers, M.-A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 800-808.

Trinkler, N., 2009. La guérison coquillière: un mécanisme de défense de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* face au *Vibrio tapetis* dans le cadre de la maladie de l'anneau brun. Université de Bretagne occidentale-Brest.

Trinkler, N., Guichard, N., Labonne, M., Plasseraud, L., Paillard, C., Marin, F., 2011. Variability of shell repair in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by the Brown Ring Disease: A microstructural and biochemical study. *Journal of invertebrate pathology* 106, 407-417.

Trinkler, N., Sinquin, G., Querne, J., Paillard, C., 2010. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. *Journal of invertebrate pathology* 104, 8-16.

Tujula, N., Radford, J., Nair, S.V., Raftos, D.A., 2001. Effects of tributyltin and other metals on the phenoloxidase activating system of the tunicate, *Styela plicata*. *Aquatic toxicology* 55, 191-201.

U

Ulevitch, R.J., Tobias, P.S., 1999. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Current opinion in immunology* 11, 19-22.

Urbanska, A., Tjallingii, W.F., Dixon, A.F., Leszczynski, B., 1998. Phenol oxidising enzymes in the grain aphid's saliva. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86, 197-203.

V

Van Holde, K.E., Miller, K.I., Decker, H., 2001. Hemocyanins and invertebrate evolution. *Journal of Biological Chemistry* 276, 15563-15566.

Van Neste, D., Tobin, D.J., 2004. Hair cycle and hair pigmentation: dynamic interactions and changes associated with aging. *Micron* 35, 193-200.

Vargas-Albores, F., Hinojosa-Baltazar, P., Portillo-Clark, G., Magallon-Barajas, F., 1998. Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. *Aquaculture Research* 29, 549-553.

W

Walker, J.R., Ferrar, P.H., 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and genetic engineering reviews* 15, 457-498.

Walker, J.R., McCallion, R.F., 1980. The selective inhibition of ortho-and *para*-diphenol oxidases. *Phytochemistry* 19, 373-377.

Wang, Q., Chen, Q.-X., Huang, X.-H., Ke, L.-N., Shi, Y., Wang, J., 2004. Enzymatic characterization and functional groups of polyphenol oxidase from the pupae of blowfly (*Sarcophaga bullata*). *Biochemistry (Moscow)* 69, 918-920.

Wappner, P., Quesada-Allué, L.A., 1996. Water loss during cuticle sclerotization in the medfly *Ceratitis capitata* is independent of catecholamines. *Journal of insect physiology* 42, 705-709.

Waxman, L., 1975. The structure of annelid and mollusc hemoglobins. *Journal of Biological Chemistry* 250, 3790-3795.

Whitaker, J.R., Lee, C.Y., 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning, Enzymatic browning and its prevention. Washington DC: American Chemistry Society, Symposium Series. ACS Publications, 2-7.

Wilczek, A., Mishima, Y., 1995. Inhibitory effects of melanin monomers, Dihydroxyindole-2-Carboxylic Acid (DHICA) and Dihydroxyindole (DHI) on mammalian tyrosinase, with a special reference to the role of DHICA/DHI ratio in melanogenesis. *Pigment cell research* 8, 105-112.

X

Xing, J., Jiang, J., Zhan, W., 2012. Phenoloxidase in the scallop *Chlamys farreri*: Purification and antibacterial activity of its reaction products generated *in vitro*. *Fish & shellfish immunology* 32, 89-93.

Xu, F., 2001. Dioxygen reactivity of laccase. *Applied biochemistry and biotechnology* 95, 125-133.

Xue, C.-B., Zhang, L., Luo, W.-C., Xie, X.-Y., Jiang, L., Xiao, T., 2007. 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid, and their derivatives as phenoloxidase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 15, 2006-2015.

Y

Yang, C.-P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M., Nakamura, N., Hayashi, N., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 2732-2735.

Yap, W.G., 1977. Population biology of the Japanese little-neck clam, *Tapes philippinarum*, in Kaneohe Bay, Oahu, Hawaiian Islands. *Pacific Science* 31, 223-244.

Yerushalmi, S., Green, R.M., 2009. Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecology letters* 12, 970-981.

Yildiz, H.B., Caliskan, S., Kamaci, M., Caliskan, A., Yilmaz, H., 2013. L-Dopa synthesis catalyzed by tyrosinase immobilized in poly (ethyleneoxide) conducting polymers. *International journal of biological macromolecules* 56, 34-40.

Yoon, J., Liboiron, B.D., Sarangi, R., Hodgson, K.O., Hedman, B., Solomon, E.I., 2007. The two oxidized forms of the trinuclear Cu cluster in the multicopper oxidases and mechanism for the decay of the native intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 13609-13614.

Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R., Golenbock, D., 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *The Journal of Immunology* 163, 1-5.

Youdim, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P., 1993. The enigma of neuromelanin in Parkinson's disease substantia nigra. *Journal of neural transmission. Supplementum* 43, 113-122.

Z

Zaręba, M., Bober, A., Korytowski, W., Zecca, L., Sarna, T., 1995. The effect of a synthetic neuromelanin on yield of free hydroxyl radicals generated in model systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1271, 343-348.

Zavarzina, A., Zavarzin, A., 2006. Laccase and tyrosinase activities in lichens. *Microbiology* 75, 546-556.

Zecca, L., Tampellini, D., Gatti, A., Crippa, R., Eisner, M., Sulzer, D., Ito, S., Fariello, R., Gallorini, M., 2002. The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals. *Journal of neural transmission* 109, 663-672.

Zhu, Y., Wang, Y., Gorman, M.J., Jiang, H., Kanost, M.R., 2003. *Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. *Journal of Biological Chemistry* 278, 46556-46564.

Zibae, A., Bandani, A.R., Malagoli, D., 2011. Purification and characterization of phenoloxidase from the hemocytes of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 158, 117-123.

Zufelato, M.S., Lourenço, A.P., Simões, Z.L., Jorge, J.A., Bitondi, M.M., 2004. Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 1257-1268.

Annexe 1 : Electrophorèse bidimensionnelle (selon Artigaud et al., 2013)

Composition du tampon d'équilibration (conserver à -20°C) :

2% SDS	4g
6M Urée	72g
0,1mM EDTA	40µL EDTA 0,5M
Bleu de bromophénol	20mg
Tris-HCl 50mM pH 8,8	7mL Tris-HCl 1,5M pH 8,8
30% glycerol	60mL glycérol
Eau ultra pure	q.s.p. 200mL

Composition du tampon de migration Tris-Glycine-SDS 10X :

Tris 250mM	30,3mg
Glycine 1,92M	144g
SDS 1%	10g
Eau ultra pure	q.s.p. 1L

Composition des gels d'agarose 1% :

Agarose (Electrophoresis Grade)	120mg
TGS 1X	12mL
Faire chauffer au micro-onde 15s	

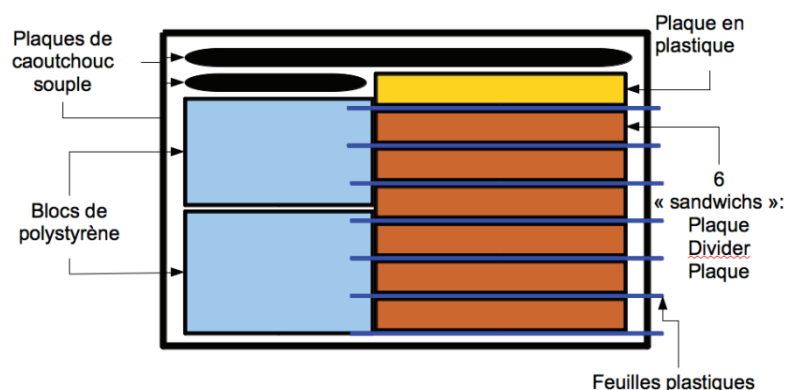


Figure 42. Schéma du montage à préparer pour couler 12 gels d'électrophorèse bidimensionnelle.

Préalablement à leur utilisation, les plaques et les « Dividers » sont lavés à l'alcool

Tableau 12. Coulage des gels : pour 12 gels préparer 2x 250 ml.

	10%	16%
Acrylamide 30%	83 ml	133 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	62,5 ml	62,5 ml
H2O	100 ml	50 ml
SDS 10%	2,5 ml	2,5 ml
APS 10%	625 µl	625 µl
TEMED	125 µl	125 µl
Volume total	250 ml	250 ml

Préparation de l'APS : 150mg pour 1,5 ml. A préparer extemporanément.

L'APS et le TEMED lançant la polymérisation, il est impératif de les ajouter au moment de couler les gels

- Verser chaque solution dans le récipient du « Gradient Maker »
- Lancer l'agitation
- Ouvrir la sortie « tuyau »
- Ouvrir le passage entre les 2 récipients

Couvrir d'Isopropanol Saturé en Tris(~1ml/gel)

Laisser ensuite polymériser 3 ou 4 heures (ou sur la nuit).

Résumé

La palourde japonaise, *Venerupis philippinarum*, a été introduite en France au début des années 70 à des fins aquacoles. Depuis 1987, d'importants épisodes de mortalité, causés par la bactérie pathogène *Vibrio tapetis*, touchent cette espèce le long des côtes françaises et européennes. Cette vibriose, appelée Maladie de l'Anneau Brun (MAB), est considérée comme une maladie d'eau froide. L'interaction tripartite entre *V. philippinarum*, *V. tapetis* et l'environnement a été explorée à travers le rôle du système enzymatique des phénoloxydases (POs) dans le but de mieux comprendre la réponse immunitaire de la palourde japonaise, la virulence de l'agent pathogène mais aussi l'impact de l'environnement et plus particulièrement de la température. Les POs sont des oxydoréductases impliquées dans la synthèse de la mélanine et de ses dérivés mais aussi dans les processus de reconnaissance du non-soi et d'encapsulation chez les invertébrés. Dans un premier temps, l'activité PO du sérum d'hémolymphe a été caractérisée d'un point de vue biochimique comme étant majoritairement de type laccase ; une activité minoritaire de type tyrosinase a également été identifiée. Des infections de palourdes par trois souches de *V. tapetis*, à différentes températures, ont mis en évidence une modulation de la réponse du système PO en fonction du temps et du compartiment étudiés. De façon générale, l'infection bactérienne s'est traduite par une augmentation de l'activité PO. Toutefois, le niveau basal d'activité PO est variable d'une population à une autre et cette variabilité semble traduire une susceptibilité différente à la MAB. L'augmentation de la température de 15 à 22°C a entraîné une augmentation des capacités immunitaires de la palourde japonaise. La température a également eu un impact sur la pathogénicité de *V. tapetis* et ce, de façon différentielle selon les souches. L'inhibition de l'activité PO observée *in vitro* en présence de produits extracellulaires bactériens souligne la complexité de l'interaction entre *V. philippinarum* et *V. tapetis*. Ainsi, le suivi de l'activité PO constitue un biomarqueur pertinent des capacités immunitaires des invertébrés marins dans l'interaction tripartite hôte-pathogène-environnement.

Mots clés : *Venerupis philippinarum* ; phénoloxydases ; laccases ; *Vibrio tapetis* ; maladie de l'anneau brun ; température ; résistance ; pathogénicité ; biomarqueur immunitaire

Abstract

The manila clam, *Venerupis philippinarum*, was introduced in France in the early 70's for aquaculture purposes. Since 1987, mass mortality events, caused by the pathogenic bacterium *Vibrio tapetis*, have occurred in this species along French and European coasts. This vibriose, called Brown Ring Disease (BRD), is considered as a cool water disease. The tripartite interaction between *V. philippinarum*, *V. tapetis* and the environment was explored through the role of the enzymatic system of phenoloxidases (POs) in order to better understand the manila clam immune response, the pathogen virulence and also the environment impact and particularly the temperature's one. POs are oxidoreductase enzymes involved in the synthesis of the melanin and its derivatives and also in the processes of non-self recognition and encapsulation in invertebrates. Firstly, PO activity was biochemically characterized in the hemolymph serum as a laccase-like activity; a minority tyrosinase-like activity was also identified. Clam inoculation with three *V. tapetis* strains, at various temperatures, highlighted a modulation of the answer of the PO system according to time post-infection and studied compartments. Overall, bacterial infection resulted in an increase in PO activity. However, the PO activity basal level varies between populations and this variability seems to reflect different susceptibility to the BRD. An increase in temperature from 15 to 22°C led to an increase in manila clam immune abilities. The temperature also had an impact on the *V. tapetis* pathogenicity and this impact was variable according to the strains. PO activity inhibition observed, *in vitro*, in the presence of bacterial extracellular products underlines the complexity of the interaction between *V. philippinarum* and *V. tapetis*. Thus, the monitoring of the PO activity constitutes a relevant biomarker of marine invertebrate immune abilities in the tripartite interaction host-pathogen-environment.

Key Words: *Venerupis philippinarum* ; phenoloxidases ; laccases ; *Vibrio tapetis* ; Brown Ring Disease ; temperature ; resistance ; pathogenicity ; immune biomarker